Die transkriptionelle Regulation des Angiotensin-AT2-Rezeptorgens und des AT2R-*binding*-Protein-Gens

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin der Biotechnologie
Jana Reinemund
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dipl. Ing. Dr. Ulf Stahl
Berichter: PD Dr. med. Heiko Funke-Kaiser
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Roland Lauster

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. Dezember 2010

Berlin 2011
D 83

Abstract

The hormone angiotensin II (Ang II) is the main effector peptide of the renin-angiotensin-system (RAS). In addition to its physiological role, Ang II is also involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Ang II elicits its effects mainly via two receptors that are located in the cell membrane, the angiotensin-AT1-receptor (AT1R) and the angiotensin-AT2-receptor (AT2R). Stimulation of these receptors leads to opposite cellular effects. In literature the role of the AT2R within cardiovascular diseases is controversially discussed. Recently, our group identified a new AT2R-binding-protein (ATBP/ATIP) that interacts in the cytoplasm with the C-terminus of the AT2R. In this dissertation, the transcriptional regulations of the AT2R- and of the ATIP1-/ATBP50-gene were characterised. Using the RLM-5'-RACE, one transcriptional start point was identified for the human AT2R-gene that is located 29 bp downstream of a TATA-box element and 1533 bp upstream of the translational start point. For the TATA-boxless ATIP1-gene two transcriptional start sites were detected 293 bp and 304 bp upstream of the translational start point. Promoter analysis indicated that the exon-1-/intron-1-region of the AT2R-gene is both necessary and sufficient for the transcription of this gene. Inverse cloning experiments revealed that sequences within this region are responsible for recruitment of the transcriptional machinery, thereby generating an alternative start point. The intronic AT2R polymorphism -G1332A is associated with protective effects of myocardial hypertrophy in women. Analysis of this polymorphism has shown that promoters containing the G allele exhibit stronger basal promoter activities compared to promoters carrying the A allele. Estrogens seem to modify the proportion of AT1R/AT2R in favour of AT2R. In this study, promoter analyses were performed to investigate the influence of the hormone 17-β-estradiol (E2) on the transcription of both target genes. These experiments have shown that E2 has no regulative influence on transcription levels of either the AT2R- or the ATIP1-gene. The protein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) is involved in Ang II mediated effects as well as in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Promoter analyses of the AT2R- and ATIP1-gene have revealed that overexpression of PARP-1 results in a decrease of the promoter activity of the AT2R-gene and an increase of the ATIP1-gene. Inhibition of enzymatic PARP-activity or the homozygous knockout of PARP-1 leads to opposite effects for both genes. These results were further verified on mRNA- and chromatin-level. Additional experiments have shown that PARP-1 activates the transcription of the ATIP1-/ATBP50-gene and function as a repressor on AT2R-transcription. In this study PARP-1 was identified as a novel transcriptional modulator of the AT2R- and the ATIP1-/ATBP50-gene.

Das Hormon Angiotensin II (Ang II) ist das Haupteffektorpeptid des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Es ist neben physiologischen Prozessen auch in die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen involviert. Ang II vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über zwei membranständige Rezeptoren, den Angiotensin-AT1-Rezeptor (AT1R) und den Angiotensin-AT2-Rezeptor (AT2R), wobei die Stimulation beider Rezeptoren gegensätzliche zelluläre Effekte vermittelt. Die Rolle des AT2R innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte kürzlich ein neues AT2R-Interaktionsprotein, das AT2R-*binding*-Protein (ATBP/ATIP), das mit dem C-Terminus des AT2R im Zytoplasma wechselwirkt. In dieser Arbeit wurden neue transkriptionelle Regulationsmechanismen des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens identifiziert und charakterisiert. Mit Hilfe der RLM-5'-RACE konnte für das humane AT2R-Gen ein transkriptioneller Startpunkt identifiziert werden, der sich 29 bp *downstream* der TATA-*box* und 1533 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt befindet. Für das TATA-*box*-lose ATIP1-Gen wurden zwei transkriptionelle Startpunkte ermittelt, die 293 bp und 304 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt lokalisiert sind. Promotoranalysen weisen auf eine zentrale Funktion der Exon-1-/Intron-1-Region des AT2R-Gens bei der Transkription hin. Mittels inversen Klonierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Sequenzen innerhalb dieser Region die Rekrutierung des Transkriptionsapparates vermitteln und dabei einen weiteren Transkriptionsstartpunkt generieren. Der intronische AT2R-Polymorphismus -G1332A wird mit protektiven Effekten bei der myokardialen Hypertrophie von Frauen assoziiert. Die Untersuchung dieses Polymorphismus hat gezeigt, dass Promotoren mit dem G-Allel im Vergleich zu Promotoren mit dem A-Allel generell eine stärkere Promotoraktivität aufweisen. Östrogene scheinen das Verhältnis von AT1R/AT2R zu Gunsten des AT2R zu verschieben. Der potenzielle Einfluss des Hormons 17-β-Östradiol (E2) auf die Transkription des AT2R- und des ATIP1-Gens wurde mit Hilfe von Promotoranalysen untersucht. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass E2 keine regulativen Effekte auf die Transkription beider Zielgene ausübt. Das Protein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) ist in die Ang II-vermittelten Effekte und in die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen involviert. Promotoruntersuchungen der beiden Zielgene haben gezeigt, dass die Promotoraktivität des AT2R-Gens durch die Überexpression von PARP-1 reprimiert und die des ATIP1-Gens induziert wird. Die Inhibierung der enzymatischen PARP-Aktivität und der *knockout* des PARP-1-Gens resultierten in Bezug auf die Promotoraktivierung der beiden Gene in gegenteiligen Effekten. Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch Untersuchungen der entsprechenden mRNA- und Chromatinebene bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass PARP-1 die Transkription des ATIP1-/ATBP50-Gens aktiviert und als Repressor auf die AT2R-Transkription wirkt. Innerhalb dieser Arbeit konnte das Protein PARP-1 als neuer transkriptioneller Modulator des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens identifiziert werden.

Inhaltsverzeichnis

Abstract V

Abkürzungen und Symbole XIII

Tabellenverzeichnis XIV

Abbildungsverzeichnis XV

1 Einleitung 1

1.1 Genregulation . . . 1
1.1.1 Promotorarchitektur . . . 1
1.2 Renin-Angiotensin-System . . . 4
1.2.1 Angiotensin-AT1-Rezeptor . . . 6
1.2.2 Angiotensin-AT2-Rezeptor . . . 7
1.2.2.1 Signalkaskade des AT2R . . . 7
1.2.2.2 Polymorphismen des AT2R-Gens . . . 11
1.2.2.3 Rolle des AT2R innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen . 11
1.2.3 AT2R-*binding*-Protein . . . 12
1.3 Östrogene . . . 14
1.3.1 Die Östrogenrezeptoren α und β . . . 15
1.3.2 Signalkaskaden der Östrogenrezeptoren . . . 16
1.3.3 Einfluss von Östrogenen auf den AT2R . . . 17
1.4 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 und Poly(ADP-Ribosyl)ierung . . . 18
1.4.1 Einfluss von PARP-1 auf den AT2R . . . 20

2 Ziel der Arbeit 23

3 Material und Methoden 25

3.1 Material . . . 25
3.1.1 Antikörper . . . 25
3.1.2 Bakterienstämme . . . 25
3.1.3 Chemikalien . . . 25
3.1.4 Enzyme . . . 26
3.1.5 Größenstandards . . . 26

3.1.6 *Kits* . . . 26
3.1.7 Medien für die Bakterienkultur . . . 26
3.1.8 Wirkstoffe für die Stimulationsexperimente . . . 27
3.1.9 Primer . . . 27
3.1.10 Puffer . . . 27
3.1.11 siRNA . . . 28
3.1.12 Vektoren . . . 28
3.1.13 Zellen und Zellkulturmedien . . . 29
3.1.14 Humane Gewebeproben . . . 30
3.1.15 Murine Gewebeproben . . . 30
3.2 Methoden . . . 31
3.2.1 Arbeiten mit Bakterien . . . 31
3.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen . . . 31
3.2.1.2 Klonierung . . . 31
3.2.2 Molekularbiologische Methoden . . . 32
3.2.2.1 RNA-Isolation . . . 32
3.2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren . . . 33
3.2.2.3 DNase-Verdau . . . 33
3.2.2.4 Reverse Transkription von RNA . . . 33
3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion . . . 33
3.2.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten . . . 35
3.2.2.7 RLM-5'-RACE . . . 35
3.2.2.8 Luziferase-RLM-5'-RACE . . . 37
3.2.2.9 Chromatin-Immunopräzipitation . . . 38
3.2.3 Zellbiologische Methoden . . . 40
3.2.3.1 Subkultivierung und Zellernte . . . 40
3.2.3.2 Kryokonservierung und Rekonstitution . . . 40
3.2.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl . . . 40
3.2.3.4 Transfektion . . . 41
3.2.3.5 Statistische Auswertung . . . 48

4 Ergebnisse **49**
4.1 Expressionsanalyse des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens . . . 49
4.2 Transkriptionsstartpunkte des humanen AT2R- und ATIP1-Gens . . . 51
4.3 Identifizierung regulativer Elemente im humanen AT2R- und ATIP1-Promotor 53
4.3.1 Charakterisierung des regulativen *cis*-Elements in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens . . . 54
4.3.2 Verifizierung des alternativen Transkriptionsstartpunkts in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens . . . 55
4.3.3 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf den humanen AT2R-Promotor . . . 57

4.4 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch Östrogene . . . 58
4.4.1 Bioinformatische Analyse des humanen AT2R- und ATIP1-Promotors 58
4.4.2 Einfluss von E2 auf die transkriptionelle Regulation des TFF1-Gens 59
4.4.2.1 Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression des TFF1-Gens 59
4.4.2.2 Einfluss von E2 auf den TFF1-Promotor . . . 60
4.4.2.3 Einfluss von E2 auf die Regulation des TFF1-Gens innerhalb des Chromatinkontextes . . . 63
4.4.3 Einfluss von E2 auf den AT2R- und ATIP1-Promotor . . . 64
4.4.4 Geschlechtsspezifische Transkription des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens *in vivo* . . . 65
4.4.4.1 Endogene Expression des AT2R- und des ATBP50-Gens in gesunden murinen Herzen . . . 65
4.4.4.2 Endogene Expression des AT2R- und des ATIP1-Gens in gesunden humanen Herzen . . . 66
4.4.4.3 Endogene Expression des murinen AT2R- und des ATBP50-Gens in pathologischen Herzen . . . 67
4.4.4.4 Endogene Expression des humanen AT2R- und des ATIP1-Gens in pathologischen Herzen . . . 68
4.5 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch PARP-1 . . . 69
4.5.1 Einfluss der PARP-Inhibierung auf die mRNA-Expression des AT2R- und ATIP1-Gens . . . 70
4.5.2 Einfluss des PARP-1-*knockouts* auf die mRNA-Expression des AT2R- und ATBP50-Gens . . . 70
4.5.3 Einfluss der PARP-1-mRNA-Repression auf die mRNA-Expression des ATIP1-Gens . . . 71
4.5.4 Einfluss von PARP-1 auf das Promotorverhalten des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens . . . 72
4.5.5 Einfluss von PARP-1 auf die Regulation des AT2R- und ATIP1-Gens innerhalb des Chromatinkontexts . . . 75
4.5.6 Einfluss von PARP-1 auf das AT2R-Gen unter AT2R-Aktivierung . . 76
4.5.7 Einfluss des PARP-1-*knockouts* auf den AT2R-Promotor unter AT2R-Aktivierung . . . 77
4.5.8 Einfluss der AT2R-Aktivierung auf mRNA-Expression des PARP-1-Gens . . . 79
4.5.9 Endogene mRNA-Expression des AT2R- und des ATBP50- Gens in PARP-1-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen . . . 79
4.5.10 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die PARP-1-Effekte . . . 80

5 Diskussion **83**
5.1 Expressionsanalyse des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens 83
5.2 Transkriptionsstartpunkte des humanen AT2R- und ATIP1-Gens 85
5.3 Identifizierung regulativer Elemente im humanen AT2R- und ATIP1-Promotor 86
5.3.1 Charakterisierung des regulativen *cis*-Elements in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens 87
5.3.2 Verifizierung des alternativen Transkriptionsstartpunkts in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens 87
5.3.3 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf den humanen AT2R-Promotor 88
5.4 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch Östrogene 89
5.4.1 Bioinformatische Analyse des humanen AT2R- und ATIP1-Promotors 89
5.4.2 Einfluss von E2 auf die transkriptionelle Regulation des TFF1-Gens 89
5.4.2.1 Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression des TFF1-Gens 90
5.4.2.2 Einfluss von E2 auf den TFF1-Promotor 90
5.4.2.3 Einfluss von E2 auf die Regulation des TFF1-Gens innerhalb des Chromatinkontexts 91
5.4.3 Einfluss von E2 auf den AT2R- und ATIP1-Promotor 92
5.4.4 Transkription des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens in gesunden Herzen 93
5.4.5 Transkription des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens in pathologischen Herzen 93
5.5 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP-1/ATBP50-Gens durch PARP-1 95
5.5.1 Einfluss des PARP-1-*knockouts* auf das AT2R-Gen nach AT2R-Aktivierung 97
5.5.2 Endogene mRNA-Expression des AT2R- und des ATBP50-Gens in PARP-1-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen 98
5.5.3 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die PARP-1-vermittelten Effekte 98

6 Zusammenfassung **101**

7 Ausblick **105**

Literaturverzeichnis **106**

A Tabellen **121**

B Vektorkarten **127**
B.1 phRL-null-Vektor 127
B.2 pGL3-*basic*-Vektor 128

B.3 pGEM-T-*easy*-Vektor-System 129
B.4 pcDNA3.1-V5-His-TOPO 130
B.5 HEG0/pSG5 131
B.6 TOPO-TA-*cloning*-Vektor 132

C Publikationsliste **133**
C.1 Artikel in Fachzeitschriften 133
C.2 Kongressbeiträge 134

D Danksagung **135**

Abkürzungen und Symbole

3-AB	3-Aminobenzamid
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ARB	AT1R-Blocker
AT1R	Angiotensin-AT1-Rezeptor
AT2R	Angiotensin-AT2-Rezeptor
ATBP50	AT2R-*binding*-Protein 50 kDa
ATIP1	AT2R-*interacting*-Protein-1
bp	Basenpaar
BRE_{down}	*downstream* TFIIB-*recognition*-Element
BRE_{up}	*upstream* TFIIB-*recognition*-Element
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Comp21	Compound 21
DCE	*downstream*-Kernpromotorelement
DPE	*downstream*-Promotorelement
E2	17β-Östradiol
ERα	Östrogenrezeptor α
ERβ	Östrogenrezeptor β
ERE	östrogenresponsives Element
ERK	extrazelluläre signalregulierte Kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormons
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
Inr	*initiator*-Element
IP	Immunopräzipitation
Irb	Irbesartan
KO	*knockout*
LH	Luteinisierendes Hormons
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEF	Maus-Embryonale-Fibroblastenzellen
MMP2	Matrix-Metallopeptidase 2
MTE	*motiv-ten*-Element

NTC	nicht-*template*-Kontrolle
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K-p85α	Phosphatidylinositol-3-Kinase-*regulatory-subunit* α
PIC	Prä-Initiationskomplex
PLZF	*promyelocytic-zinc-finger*-Protein
RER	Renin-/Prorenin-Rezeptor
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA-Pol II	RNA-Polymerase II
RT	Reverse Transkription
SERMs	selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
SHR	spontane hypertensive Ratten
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus (engl. *single nucleotid polymorphism*)
TAF	TBP-assoziierter Faktor
TBP	TATA-*box*-Bindeprotein
TF	Transkriptionsfaktor
TFF1	*trefoil factor* 1
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen (engl. *vascular smooth muscle cells*)
WT	Wildtyp
Y2H	Zwei-Hybridsystem (engl. *yeast-two-hybrid* System)

Tabellenverzeichnis

3.1 Temperaturprogramm für die Standard-PCR 34
3.2 Temperaturprogramm für die *HotStarTaq*-PCR 34
3.3 Temperaturprogramm für die *real-time*-PCR 34
3.4 Basale Transfektionsbedingungen 45
3.5 Transfektionsbedingungen unter der Stimulation mit E2 46

4.1 Expressionsanalyse in humanen Zellen 49
4.2 Expressionsanalyse in murinen Zellen 51

A.1 Chemikalienliste 121
A.2 Reagenzien in der Zellkultur 122
A.3 Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des humanen AT2R-Gens 123
A.4 Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des ATIP1-Gens . . . 123
A.5 Primer der RLM-5'-RACE 124
A.6 Primer im Rahmen der Chromatin-Immunopräzipitation 124
A.7 Primer der Expressionsanalyse der *real-time*-PCR 125
A.8 Primer der Expressionsanalyse der qualitativen PCR 125

Abbildungsverzeichnis

1.1 Aufbau des eukaryontischen Promotors 2
1.2 Aufbau des eukaryontischen Kernpromotors 4
1.3 Renin-Angiotensin-System 5
1.4 Schematische Darstellung des AT2R und seiner Interaktionspartner 9
1.5 Darstellung der ATBP-Genstruktur 12
1.6 Bioinformatisch prognostizierte Sekundärstruktur der ATBP-Proteinfamilie 13
1.7 Interaktion des AT2R mit dem Protein ATBP50 14
1.8 Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der Östrogenrezeptoren α und β 15
1.9 Signalkaskaden der Östrogenrezeptoren 16
1.10 Schematische Darstellung der PARP-1-Proteinstruktur 19
1.11 Schematische Darstellung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung eines Akzeptorproteins 20

3.1 Lokalisation der Primer in der RLM-5'-RACE 36
3.2 Lokalisation der Primer in der Luziferase-RLM-5'-RACE 37
3.3 Darstellung der generierten humanen AT2R-Promotorkonstrukte 42
3.4 Darstellung des Exon-1-/Intron-1-Promotorkonstrukts des AT2R-Gens in *sense*- und inverser Orientierung 42
3.5 Position des AT2R-Polymorphismus -G1332A sowie Darstellung des Exon-1-/Intron-1-Promotorkonstrukts mit dem A-Allel und dem G-Allel 43
3.6 Promotor- und 5'-Struktur des ATIP1-Gens 43
3.7 Promotor- und 5'-Struktur des TFF1-Gens 44

4.1 Paarweises Sequenzalignment der humanen AT2R-DNA-Sequenz und des PCR-Amplifikats 50
4.2 Darstellung des transkriptionellen Startpunktes des humanen AT2R-Gens . 52
4.3 Darstellung der beiden transkriptionellen Startpunkte des ATIP1-Gens . . . 52
4.4 Promotorverhalten des humanen AT2R-Gens unter basalen Bedingungen . . 53
4.5 Promotorverhalten des ATIP1-Gens unter basalen Bedingungen 54
4.6 Untersuchung der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Promotors . 55
4.7 Darstellung des alternativen Transkriptionsstartpunktes des humanen AT2R-Gens 56
4.8 Darstellung aller transkriptionellen Startpunkte des humanen AT2R-Gens . 57

4.9 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die Promotoraktivität des humanen AT2R-Gens . . . 57
4.10 Bioinformatische Promotoranalyse des humanen AT2R-, ATIP1- und TFF1-Gens . . . 58
4.11 E2-Einfluss auf die mRNA-Expression des TFF1-Gens . . . 59
4.12 Einfluss von ethanol- beziehungsweise wasserlöslichem E2 auf die Transkription der TFF1-Gens . . . 61
4.13 E2-Einfluss auf die Promotorkonstrukte des TFF1-Gens . . . 62
4.14 E2-Einfluss auf die Regulation des TFF1-Gens innerhalb des Chromatinkontextes . . . 63
4.15 E2-Einfluss auf den humanen AT2R- und ATIP1-Promotor . . . 64
4.16 Geschlechtsspezische mRNA-Expression des AT2R- und ATBP50-Gens im Herzen von gesunden Wistar-Ratten . . . 65
4.17 Endogene mRNA-Expression des humanen AT2R-Gens im Herzgewebe des linken Ventrikels gesunder Männer und Frauen . . . 66
4.18 Endogene mRNA-Expression des ATIP1-Gens im Herzgewebe des linken Ventrikels gesunder Männer und Frauen . . . 67
4.19 Endogene mRNA-Expression des murinen AT2R- und ATBP50-Gens in pathologischen Herzgeweben . . . 68
4.20 Endogene mRNA-Expression des humanen AT2R- und ATIP1-Gens in pathologischen Herzgeweben . . . 69
4.21 Einfluss der PARP-Inhibierung auf die endogene mRNA-Expression des humanen AT2R- und ATIP1-Gens . . . 70
4.22 Endogene mRNA-Expression des AT2R- und ATBP50-Gens in MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- und WT-Tieren . . . 71
4.23 mRNA-Expression des ATIP1-Gens nach der Inhibierung der PARP-1-mRNA mittels siRNA . . . 71
4.24 Einfluss von PARP-1 auf die Promotoraktivität des AT2R-Gens . . . 73
4.25 Einfluss von PARP-1 auf die Promotoraktivität des ATIP1-/ATBP50-Gens 74
4.26 Einfluss der PARP-Inhibierung auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II, TBPs und PARP-1 an die Promotoren des AT2R- und ATIP1-Gens . . . 76
4.27 mRNA-Expression des AT2R-Gens in MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen unter der Aktivierung des AT2R . . . 77
4.28 Promotorverhalten des AT2R-Gens in PARP-1-*KO*-Zellen unter AT2R-Aktivierung . . . 78
4.29 Endogene mRNA-Expression von PARP-1 in PARP-1-WT-Zellen unter AT2R-Aktivierung . . . 79
4.30 Endogene mRNA-Expression des AT2R- und des ATBP50-Gens in Herz, Niere und im Gehirn von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen . . . 81
4.31 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die PARP-1-vermittelten Effekte . . . 82

6.1 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-Gens 104

B.1 Karte des phRL-null-Vektors 127
B.2 Karte des Vektors pGL3-*basic* 128
B.3 Karte des Vektors pGEM-T-*easy* 129
B.4 Karte des Vektors pcDNA3.1-V5-His-TOPO von Invitrogen 130
B.5 Karte des Vektors HEG0/pSG5 131
B.6 Karte des TOPO-TA-*cloning*-Vektors 132

1 Einleitung

1.1 Genregulation

Die Genregulation in Eukaryonten steuert die Anpassung der Zelle an unterschiedliche Lebensbedingungen. Sie wird sowohl durch endogene als auch exogene Signale beeinflusst. Die Expression von Genen bezeichnet den gesamten Prozess, bei dem eine im Gen enthaltene Information in ein Genprodukt transformiert wird. In eukaryontischen Zellen beginnt die Genexpression im Zellkern mit der Transkription der genetischen Information von der DNA zu einer Vorläufer-mRNA (prä-mRNA), die durch posttranskriptionelle Modifikationen in eine reife mRNA konvertiert und anschließend ins Zytoplasma transloziert wird, wo die Translation stattfindet. Das Prozessieren der prä-mRNA in eine funktionelle mRNA beinhaltet das Spleißen von nicht kodierenden Intronen, die damit assoziierte Ligation der flankierenden Exone, das *capping* sowie die Polyadenylierung des 3'-Terminus. Zur Initiation der Transkription interagieren Transkriptionsfaktoren (TFs) mit der RNA-Polymerase II und bilden den sogenannten Prä-Initiationskomplex (PIC), der anschließend mit der Promotorregion eines Gens wechselwirkt (Kadonaga 2005). Die Genexpression wird außerdem auf der Transkriptionsebene über das Chromatinremodelling, Aktivatoren und Repressoren sowie beim Prozessieren und dem Transport in das Zytoplasma reguliert.

1.1.1 Promotorarchitektur

Ein Promotor ist ein DNA-Abschnitt auf einem Gen, der die Transkription kontrolliert. Promotoren sind üblicherweise aus den folgenden drei Regionen aufgebaut: (i) einem Kernpromotor, (ii) einer proximalen und (iii) einer distalen Promotorregion (Abbildung 1.1). Der Kernpromotor ist die Bindungsstelle für den basalen Transkriptionsapparat, der aus TFs und der RNA-Polymerase II aufgebaut ist (Thomas and Chiang 2006). Er befindet sich 36 bp vor (*upstream*) bis 36 bp hinter (*downstream*) dem transkriptionellen Startpunkt und umfasst die minimale DNA-Sequenz, die für eine nicht-regulierte oder basale Transkription notwendig ist (Ptashne 2002). In der proximalen Promotorregion sind sowohl aktivierende als auch reprimierende, *cis*-wirkende Elemente lokalisiert, die mit *trans*-wirkenden Elementen interagieren und die Promotoraktivität modulieren können. Zu den *trans*-wirkenden Elementen gehören beispielsweise TFs oder *enhancer*-bindende Proteine. *Cis*-wirkende Elemente können in unmittelbarer Nachbarschaft zum kodierenden Bereich oder bis zu mehreren hundert bp *upstream* vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen.

Sie reagieren auf bestimmte Faktoren, wie beispielsweise auf Hormone oder auf die Änderung von Umweltbedingungen und üben daraufhin Einfluss auf die Genregulation aus. An die proximale Promotorregion schließt sich im *upstream*-Bereich die distale Promotorregion an, die ebenfalls regulatorische Elemente sowie Bindungsmotive für TFs enthält und beispielsweise durch Hormone induzierbar ist.

Zusätzlich existieren auf der DNA *enhancer*- und *silencer*-Elemente, die bis zu mehreren tausend Basenpaare *upstream* oder *downstream* vom Promotor lokalisiert sein können und über die Ausbildung einer dreidimensionalen *supercoil*-Struktur die DNA in die räumliche Nähe zu der Promotorsequenz bringen (Butler and Kadonaga 2002). Sie agieren unabhängig von ihrer Orientierung im Promotor. *Enhancer* fördern die Anlagerung des Transkriptionskomplexes an den Promotor und verstärken so die Transkriptionsaktivität eines Gens. *Silencer* dagegen setzen im Zusammenspiel mit TFs die Transkriptionsaktivität eines Gens herab. Daneben existieren sogenannte *insulatoren*, welche die Interaktion zwischen einem *enhancer* beziehungsweise *silencer* und dem Promotor inhibieren können, indem sie deren räumliche Annäherung im benachbarten kondensierten Chromatin verhindern (Brasset and Vaury 2005).

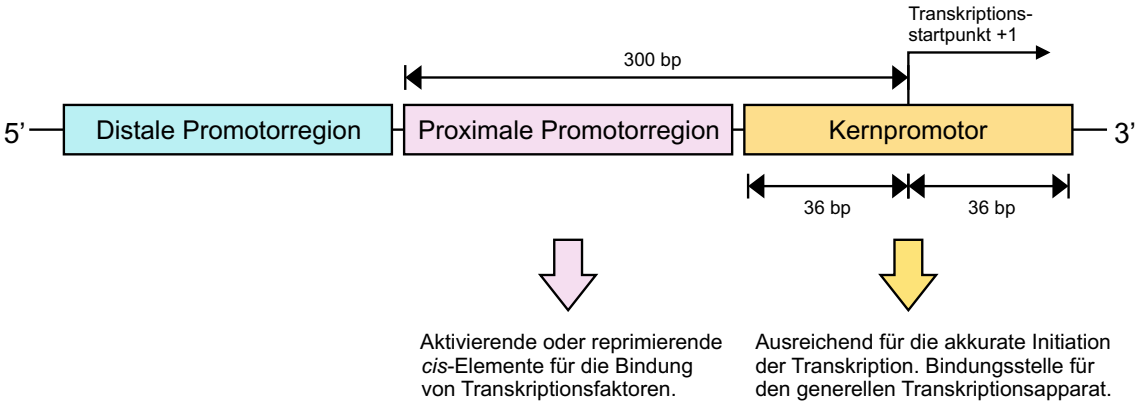


Abbildung 1.1: Aufbau des eukaryontischen Promotors. Der Promotor besteht aus einem Kernpromotorelement, einer proximalen sowie einer distalen Promotorregion.

Bis heute wurden sieben Kernpromotorelemente identifiziert, die in eukaryontischen Promotoren enthalten sein können und für die Promotorfunktion sowie für die korrekte Rekrutierung und Orientierung des PICs wichtig sind (Thomas and Chiang 2006). Diese sind in der Abbildung 1.2 schematisch dargestellt. Der Kernpromotor kann (i) eine TATA-*box*, (ii) ein *initiator*-Element (Inr), (iii) ein *upstream*-TFIIB-*recognition*-Element (BRE_{up}) sowie (iv) ein *downstream*-TFIIB-*recognition*-Element (BRE_{down}), (v) ein *downstream*-Promotorelement (DPE), (vi) ein *motiv-ten*-Element (MTE) und (vii) ein *downstream*-Kernpromotorelement (DCE) enthalten.

Bei der TATA-*box* handelt es sich um eine A/T-reiche Domäne mit der Konsensussequenz 5'-TATA(A/T)A(A/T)(A/G)-3', die sich 25 bis 30 bp *upstream* des transkriptionellen Startpunkts (+1) befindet. Die Erkennung der TATA-*box* durch das TATA-*binding*-Protein (TBP), häufig als Komponente des generellen TF (GTF) TFIID, ist der

initiale Schritt bei der Ausbildung des PICs (Kadonaga 2005). Nach der Rekrutierung von TBP an die TATA-*box* erfolgt die Bindung des GTFs TFIIB, wodurch ein stabiler ternärer Komplex entsteht. Dieser rekrutiert den RNA-Polymerase II-TFIIF-Komplex. In TATA-*box* enthaltenen Promotoren ist die Ausbildung dieses Protein-DNA-Komplexes der initiale Schritt für die Rekrutierung des Transkriptionsapparates (Thomas and Chiang 2006).

Das Inr-Element besitzt die Konsensussequenz 5'-PyPyAN(T/A)PyPy-3' und ist direkt am transkriptionellen Startpunkt -2 bis +5 lokalisiert. Es ist Bestandteil von Promotoren mit und ohne TATA-*box* und dient als Bindungsstelle für die TAF (TBP-assoziierte Faktor)-Untereinheiten des generellen Transkriptionsfaktors TFIID. TFIID kann die Konsensussequenz des Inr-Elements spezifisch erkennen. TBP allein ist dagegen nicht in der Lage, an das Inr-Element zu binden. Das Inr-Element kann den Startpunkt in Promotoren, die keine TATA-*box* enthalten, determinieren oder die Promotoraktivität von Promotoren mit einer TATA-*box* erhöhen (Chen and Manley 2003).

TFIIB-*recognition*-Elemente (BREs) sind Kernpromotorbereiche, welche die Transkription durch die Interaktion mit dem generellen Transkriptionsfaktor TFIIB stimulieren (Butler and Kadonaga 2002). Das BRE_{up} schließt direkt im *upstream*-Bereich an die TATA-*box* an und befindet sich somit etwa -38 bis -32 bp *upstream* des Transkriptionsstarts. Es besitzt die Konsensussequenz 5'-(G/C)(G/C)(G/A)CGCC-3' und wird über ein *helix-turn-helix*-DNA-Bindemotiv des generellen Transkriptionsfaktors TFIIB kontaktiert. Die TFIIB-BRE_{up} -Interaktion kann unabhängig von TBP erfolgen und hilft bei der Orientierung des PICs (Tsai and Sigler 2000). Die Interaktion von TFIIB mit dem BRE_{down} findet dagegen über die Konsensussequenz 5'-(G/A)T (T/G/A)(T/G)(G/T)(T/G)(T/G)-3' statt und scheint in Abhängigkeit von TBP zu erfolgen (Deng and Roberts 2005). Beide BREs werden zusätzlich in Promotoren gefunden, die keine TATA-*box* enthalten. Sie können sowohl aktive als auch repressive Effekte auf die Transkription ausüben.

Downstream-Kernpromotorelemente (DPEs) wurden initial in *Drosophila melanogaster* identifiziert, sind aber auch im Menschen existent. Sie sind zwischen +29 bis +35 bp *downstream* des transkriptionellen Startpunkts lokalisiert und besitzen die Konsensussequenz 5'-(A/G)G(A/T)CGTG-3'. Sie interagiern mit TFIID, aber nicht direkt mit TBP. Das DPE ist nur im Zusammenspiel mit einem Inr-Element funktionell, da TFIID kooperativ an die Konsensussequenzen des Inr-Elements und des DPEs bindet. Fast alle DPE-enthaltenen Promotoren besitzen keine TATA-*box* (Butler and Kadonaga 2002).

Das MTE und das DCE befinden sich ebenfalls *downstream* des Transkriptionsstartpunkts. Das MTE fungiert in Verbindung mit dem Inr-Element und verstärkt die RNA-Polymerase II vermittelte Transkription. Es kann sowohl den Mangel einer TATA-*box* und/oder eines DPEs funktionell substituieren als auch synergistisch mit der TATA-*box* und dem DPE in einer Inr-unabhängigen Weise wirken und so die Promotoraktivität verstärken (Lim et al. 2004). Das DCE wird über die TAF1-Untereinheit kontaktiert. Es besteht aus drei Subelementen, dem S_I-, S_{II}- und S_{III}-Element, welche die Konsensussequenzen 5'-CTTC-3', 5'-CTGT-3' und 5'-AGC-3' enthalten und im *downstream*-Bereich etwa +6 bis +34 bp vom Transkriptionsstart entfernt liegen (Lee et al. 2005).

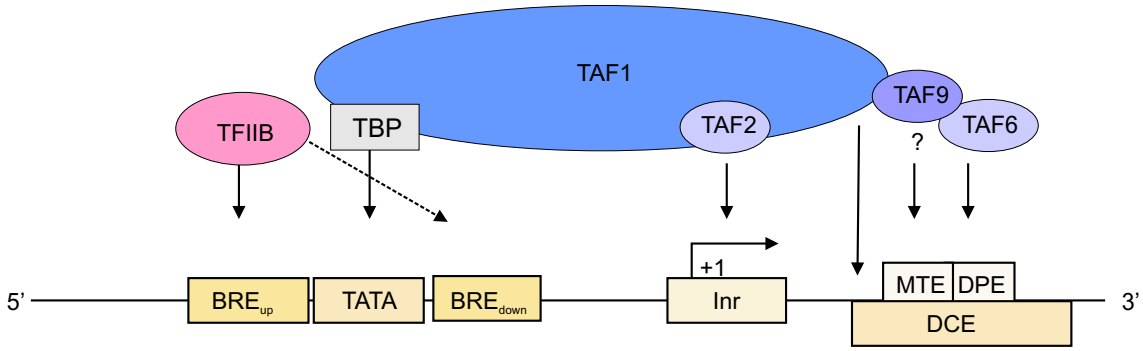


Abbildung 1.2: Aufbau des eukaryontischen Kernpromotors und die Interaktion der Transkriptionsfaktoren TFIID und TFIIB mit den sieben Kernpromotorelementen TFIIB-*recognition*-Element$_{upstream}$ (BRE$_{up}$), TATA-*box* (TATA), TFIIB-*recognition*-Element$_{downstream}$ (BRE$_{down}$), Inr-Element (Inr), *downstream*-Promotorelement (DPE), *motiv-ten*-Element (MTE) und dem *downstream*-Kernpromotorelement (DCE). TFIID besteht aus TBP und ca. 13 TBP-assoziierten Faktoren (TAFs). Der Interaktionspartner des MTEs ist bisher noch unbekannt (Abbildung nach Thomas and Chiang (2006)).

Transkriptionsfaktoren vermitteln ihre Wirkung häufig über die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren. Zu den DNA-bindenden-Strukturen innerhalb der Transkriptionsfaktoren zählen beispielsweise das *zinc-finger*- oder das *helix-turn-helix*-Motiv. Sie können in generelle TF und spezifische TF unterteilt werden.

Generelle Transkriptionsfaktoren enthalten Bindungsmotive für die Kernpromotorregion. Zu ihnen gehören: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH. Die beiden Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB können sowohl spezifisch als auch unabhängig mit TBP interagieren (Thomas and Chiang 2006). Bei TFIID handelt es sich um einen Proteinkomplex, der aus TBP und ca. 13 TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammengesetzt ist (Burley and Roeder 1996). TFIIB kann zusätzlich spezifische Kontakte mit dem BRE eingehen. Die GTFs TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den sogenannten Prä-Initiationskomplex (Butler and Kadonaga 2002).

Induzierbare oder spezifische Transkriptionsfaktoren können die Bildung des basalen Promotorkomplexes beschleunigen oder inhibieren. Zu den spezifischen Transkriptionsfaktoren gehören zum Beispiel das Protein p53 oder der GAGA-Transkriptionsfaktor (GAF), der über ein *zinc-finger*-Motiv an GA/CT-reiche Sequenzen innerhalb des Promotors von Zielgenen bindet kann (Adkins et al. 2006).

1.2 Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) bezeichnet eine Enzym-Hormon-Kaskade, die bei der homöostatischen Kontrolle des arteriellen Blutdrucks sowie bei der Aufrechterhaltung des Salz- und Wasserhaushalts des Körpers eine essenzielle Rolle spielt. Neben dem zirkulierenden endokrinen RAS, bei dem die Nieren und die Leber als Enzym- beziehungsweise

Substratquellen fungieren, existiert in verschiedenen Organen ein lokales autokrines RAS, so zum Beispiel in der Haut (Steckelings et al. 2005). Tigerstedt und Bergmann identifizierten bereits am Ende des 19. Jahrhunderts in der Niere eine blutdrucksteigernde Substanz, die sie Renin nannten.

Die RAS-Kaskade beginnt mit der Biosynthese des Enzyms Renin im juxtaglomerulären Apparat in der Niere, der den Blutdruck im *vas afferens* sowie den Salzgehalt des Harns im Harnkanälchen registriert und auf Signale des vegetativen Nervensystems sowie verschiedener Hormone reagiert (Unger and Li 2004). Die Sekretion von Renin wird durch folgende unabhängige Faktoren reguliert: (i) verminderte Durchblutung des Nierenkörperchens, wodurch ein reduzierter Blutdruck an den Barorezeptoren des *vas afferens* gemessen wird, (ii) Änderung des NaCl-Transportes zu den *macula densa*-Zellen des distalen Tubulus, (iii) Aktivierung des sympathischen Nervensystems über β1-adrenerge Rezeptoren und (iv) einen negativen *feedback*-Mechanismus durch direkte Aktionen von Angiotensin II (Ang II) an den juxtaglomerulären Zellen (Atlas 2007). Das Enzym Renin wird freigesetzt, wenn der Blutdruck abfällt und/oder ein Verlust an Kochsalz und Wasser beziehungsweise des Blutvolumens auftritt.

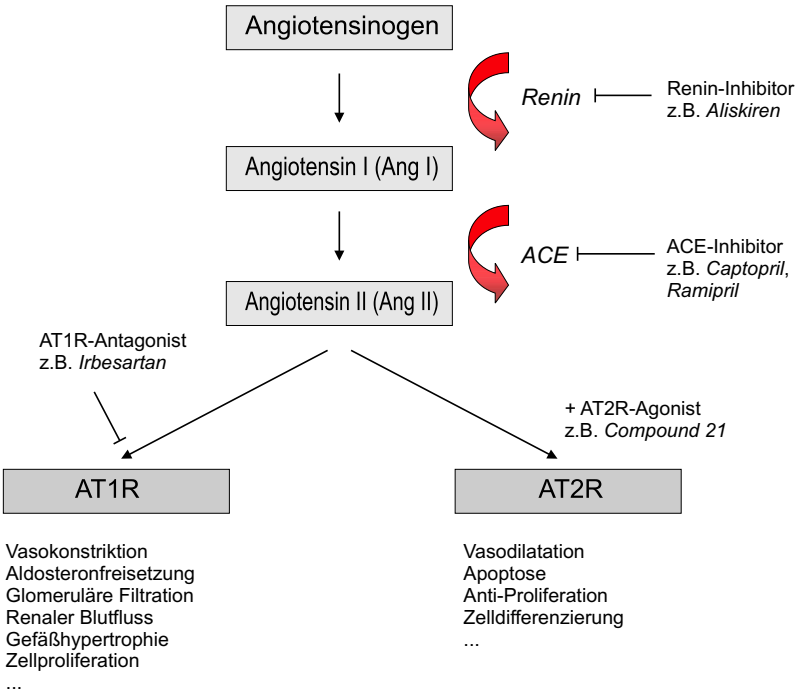


Abbildung 1.3: Komponenten der RAS-Kaskade und die Effekte seiner Rezeptoren. Angiotensin-Konversionsenzym (ACE), Angiotensin-AT1-Rezeptor (AT1R), Angiotensin-AT2-Rezeptor (AT2R).

Das in den Nieren freigesetzte Renin wirkt als proteolytisches Enzym. Es konvertiert das in der Leber synthetisierte Hormon Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I (Ang I). Dieses wird anschließend durch das Angiotensin-Konversionsenzym hydrolysiert, wodurch das Oktapeptid Ang II entsteht. Zusätzlich kann Ang I durch Endopeptidasen direkt in Ang (1-7) konvertiert werden. Ang II ist das primäre aktive Produkt der RAS-Kaskade und vermittelt eine Reihe physiologischer sowie pathophysiologischer Effekte, zu denen beispielsweise Vasokonstriktion, Zellprofileration oder die Aldosteronfreisetzung zäh-

len. Das Hormon Ang II wirkt hauptsächlich über zwei Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind, den Angiotensin-AT1-Rezeptor (AT1R) und den Angiotensin-AT2-Rezeptor (AT2R). Neben diesen beiden Rezeptoren existieren zwei weitere Angiotensin-Rezeptorsubtypen, der Angiotensin-AT3-Rezeptor (AT3R) sowie der Angiotensin-AT4-Rezeptor (AT4R) (Atlas 2007).

Die RAS-Kaskade ist neben physiologischen Prozessen auch als pathogenetischer Faktor in die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen involviert. Aus diesem Grund wurde nach pharmakologischen Therapieansätzen gesucht, welche die Entstehung des RAS-Effektorpeptids Ang II, oder dessen Wirkung am Rezeptor blockieren. 1977 wurde mit Captopril der erste ACE-Hemmer entwickelt, der das Angiotensin-Konversionsenzym der RAS-Kaskade hemmt und dadurch die Transformation des Hormons Ang I in Ang II verhindert (Abbildung 1.3). Diese Inhibierung resultiert in der Abnahme der Ang II-Konzentration am AT1R sowie AT2R und führt zu einer Abnahme des Blutdrucks. Ein weiterer Therapieansatz besteht in der Inhibierung der Bindung von Ang II an den AT1R, da diese Interaktion die Vasokonstriktion der Gefäßmuskelzellen in Arteriolen verursacht, die wiederum in einer Gefäßverengung und damit in der Erhöhung des Blutdrucks resultiert. 1988 wurden die ersten nichtpeptidischen AT1R-Antagonisten, wie beispielsweise das Irbesartan, entwickelt. Heutzutage stehen sogenannte AT2R-Agonisten im Fokus der Pharmakologie, zu denen beispielsweise der nichtpeptidische Agonist Compound 21 (Comp21) zählt (Kaschina et al. 2008). 2007 kam mit Aliskiren der erste orale Renin-Inhibitor zur Behandlung der Hypertonie in den USA auf den Markt.

1.2.1 Angiotensin-AT1-Rezeptor

Das AT1R-Gen ist auf Chomosom 3 lokalisert und kodiert für 359 Aminosäuren. Der AT1R besteht aus sieben transmembranen Domänen und gehört zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Er wird beispielsweise von den Nebennieren, der Leber, den Nieren, dem Gehirn oder von adipösem Gewebe exprimiert (de Gasparo et al. 2000). In Nagetieren existieren zwei unterschiedliche AT1R-Subtypen, der AT1aR und der AT1bR. Beide Subtypen weisen eine 95%ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf. Der AT1R vermittelt eine Vielzahl der identifizierten physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen von Ang II, zu denen unter anderem Zellproliferation, inflammatorische Immunantworten oder oxidativer Stress gehören. Daneben übt er Effekte auf das kardiovaskuläre System (Vasokonstriktion), auf die Nieren (Hemmung der Reninabgabe) oder auf die Nebennierenrinde (Stimulation der Aldosteronsynthese) aus (Atlas 2007). Die Bindung von Ang II an den AT1R resultiert in einer Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Interaktion mit G-Proteinen initiiert und die Signalübertragung über verschiedene Effektorsysteme, wie beispielsweise über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), in der Plasmamembran auslöst. Der AT1R kann zusätzlich mit dem Bradykinin-B2-Rezeptor eine heterodimere Bindung eingehen, die unter anderem in die Pathophysiologie der Präklampsie involviert ist (Abdalla et al. 2001).

1.2.2 Angiotensin-AT2-Rezeptor

Das X-chromosomale AT2R-Gen kodiert für 363 Aminosäuren. Die Homologie der Aminosäuresequenz zwischen dem AT1R und dem AT2R beträgt 32% (de Gasparo et al. 2000; Berk 2003). Der AT2R besitzt ebenfalls sieben transmembrane Domänen. Formal gehört der AT2R zu der Familie der GPCRs. Er agiert jedoch nicht über den klassischen G-Protein-gekoppelten Signalweg (Jones et al. 2008). Er kann mit dem AT1R heterodimere Bindungen eingehen, aber auch Homodimere bilden (Abdalla et al. 2001).

Während der Embryonalentwicklung wird der AT2R ubiquitär exprimiert und ist gegenüber dem AT1R der dominierende Rezeptor (Grady et al. 1991). Nach der postnatalen Periode nimmt die Expression des AT2R jedoch stark ab und wird nur noch von wenigen Geweben exprimiert, zu denen unter anderen vaskuläre Zellen, das Gehirn oder adrenale, renale sowie kardiale Strukturen zählen (de Gasparo et al. 2000). Trotz der geringen Expression in adultem Gewebe wird der AT2R mit wichtigen Effekten der RAS-Kaskade in Zusammenhang gebracht, wie zum Beispiel mit Vasodilatation, Antiproliferation, Apoptose vaskulärer glatter Muskulatur sowie Wachstumshemmung oder dem Remodelling im Herzen (Carey and Siragy 2003). Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise bei vaskulären Verletzungen (Nakajima et al. 1995), Myokardinfarkt (Nio et al. 1995), Herzinsuffizienz (Ohkubo et al. 1997), Niereninsuffizienz (Bautista et al. 2001), Ischämie im Gehirn (Makino et al. 1996) oder bei Verletzungen der Haut (Steckelings et al. 2005) nimmt die Expression des AT2R auch im adulten Organismus signifikant zu.

1.2.2.1 Signalkaskade des AT2R

Direkte Interaktionspartner des AT2R

Die Interaktionen des AT2R mit unterschiedlichen Proteinen ist im Folgenden zusammengefasst und in der Abbildung 1.10 schematisch dargestellt:

- **AT2R-Signalübertragung über die Aktivierung von Phosphatasen**
  In der Literatur sind drei spezifische Phosphatasen beschrieben, die *downstream* der AT2R-Signalkaskade lokalisiert sind und durch eine AT2R-Aktivierung stimuliert werden: die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Phosphatase-1 (MKP-1) (Horiuchi et al. 1997), die Protein-Tyrosinphosphatase SHP-1 (Bedecs et al. 1997) und die Proteinphosphatase-2A (PP2A) (Huang et al. 1995).

  Die G$\beta\gamma$-unabhängige konstitutive Assoziation der G-Proteinuntereinheit α mit der Phosphatase SHP-1 ist essenziell für die AT2R-vermittelte Aktivierung von SHP-1 (Feng et al. 2002). Diese Wechselwirkung resultiert in einer Abnahme der zellulären Tyrosinphosphorylierungen (Berk 2003). Die Stimulation der Phosphatasen SHP-1 und MKP-1 führt zur Inhibierung der MAPK-Aktivität und wird beispielsweise mit antiproliferierenden Effekten des AT2R im Zusammenhang gebracht, da Wachstumsfaktoren ihre Effekte über Tyrosinkinase-Rezeptoren vermitteln (Kaschina and Unger

2003). Die extrazelluläre signalregulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2) spielt innerhalb dieser Phosphorylierungskaskade eine wichtige Rolle. Ihre Inhibierung resultiert in einer Blockade von AT1R- sowie wachstumsfaktorvermittelten Signalwegen, die in Zellwachstum und Differenzierungsprozesse involviert sind (Stoll et al. 1995).

- **AT2R-Signalkaskade über die Aktivierung des NO/cGMP Systems**
  Ang II führt über eine AT2R- und/oder AT1R-Aktivierung zu einer Zunahme des Stickstoffmonoxids- (NO) und/oder des zyklischen Guanin-3',5'-Monophosphat (cGMP)-Spiegels (Widdop et al. 2008). NO und cGMP stimulieren eine cGMP-abhängige Proteinkinase, die wiederum zu einer Abnahme der Aktivität des GTPase-Proteins RhoA führt und so in einer Reprimierung der AT1R-vermittelten Vasokonstriktion resultiert (Savoia et al. 2005). Die AT2R-Aktivierung kann außerdem endogenes Bradykinin (BK) freisetzen (Siragy et al. 1996).

- **G-Protein-Kopplung des AT2R**
  Zhang and Pratt (1996) haben gezeigt, dass der AT2R formal zu der Superfamilie der GPCRs gehört, da der Rezeptor sieben transmembrane Domänen aufweist und sowohl mit dem Gαi2-Protein als auch mit dem Gαi3-Protein interagieren kann. Die Aktivierung der Gαi-Untereinheit erfordert die Präsenz der G$\beta\gamma$-Untereinheit (Hansen et al. 2000). Die Bindung von Ang II an den AT2R wird durch die G-Proteinbindung an den Rezeptor jedoch nicht beeinflusst, was für eine atypische Rolle der G-Proteine bei der AT2R-Funktion spricht (Berk 2003).

- **Protein-Protein-Interaktion des AT2R mit PLZF**
  Senbonmatsu et al. (2003) identifizierten mit Hilfe eines *yeast-two-hybrid*-Systems (Y2H) und unter der Verwendung einer humanen cDNA-Bibliothek des Gehirns das *promyelocytic-zinc-finger*-Protein (PLZF) als zytoplasmatischen Interaktionspartner des AT2R. Nach der Bindung von PLZF an den C-Terminus des AT2R und der Tanslokation von PLZF in den Zellkern aktiviert PLZF den Promotor der regulativen Untereinheit p85α der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die wiederum in einer Zunahme des p85α-PI3K-Spiegels resultiert und mit der Promotion des Wachstums von Kardiomyozyten assoziiert wird (Senbonmatsu et al. 2003).

- **Protein-Protein-Interaktion des AT2R mit ATIP/ATBP**
  Wruck et al. (2005) konnten unter Verwendung eines Y2H-Systems ein weiteres Interaktionsprotein, das sogenannte AT2R-*binding*-Protein (ATBP), identifizieren, welches ebenfalls im Zytoplasma mit dem C-Terminus des AT2R wechselwirkt. Für diese Untersuchungen wurde eine embryonale Maus-cDNA-Bibliothek verwendet. Zeitgleich wurde das Protein ATBP von zwei weiteren Arbeitsgruppen kloniert, die das Protein AT2R-*interacting*-Protein (ATIP) (Nouet et al. 2004) beziehungsweise *mitochondrial-tumorsuppressor*-Protein-1 (MTUS1) (Seibold et al. 2003) nannten.

Neben den direkten Interaktionen mit Proteinen führt die Aktivierung des AT2R ebenfalls zu der Regulation des *zinc-finger-homodomain-enhancerbinding*-Proteins Zfhep (Stoll et al. 2002).

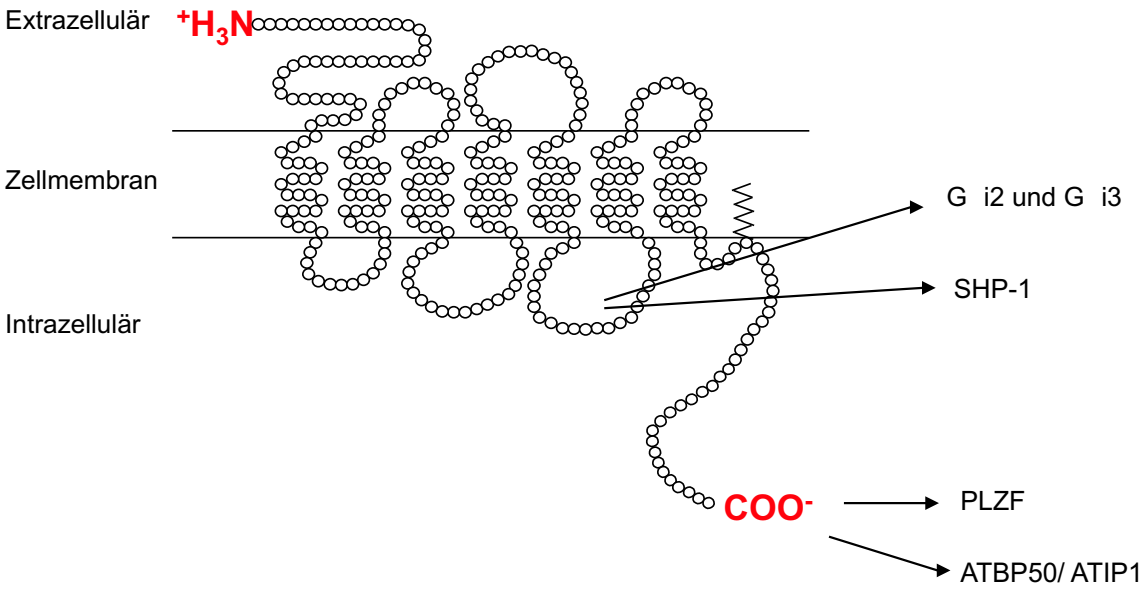


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des AT2R und seiner Interaktionspartner. Das G-Protein α2 (Gαi2), das G-Protein α3 (Gαi3) sowie die Protein-Tyrosinphosphatase (SHP-1) interagieren mit der dritten intrazellulären Schleife des AT2R. Das *promyelocytic-zinc-finger*-Protein (PLZF) und das murine AT2R-*binding*-Protein 50 kDa (ATBP50) beziehungsweise das humane AT2R-*interacting*-Protein 1 (ATIP1) wechselwirken im Zytoplasma mit dem C-Terminus des AT2R.

AT2R und die Signalkaskade des Renin-Rezeptors

Renin ist ein proteolytisches Enzym, das hauptsächlich in den juxtaglomerulären Zellen der Niere synthetisiert und freigesetzt wird und die Konversion von Angiotensinogen in Ang I katalysiert. Die Vorstufe des Renins ist das inaktive Prorenin, das durch die Abspaltung von 43 Aminosäuren am N-Terminus in das reife Renin transformiert wird (Schefe et al. 2008). Unter normalen Bedingungen bestehen bis zu 90% des gesamten Reninspiegels im Plasma aus Prorenin. Unter pathophysiologischen Umständen dagegen, wie zum Beispiel bei Diabetes, kann die Reninkonzentration signifikant zunehmen (Deinum et al. 2001). Diese führt wiederum zu einem Anstieg der Renin-Prorenin-Aktivität und resultiert in einer Zunahme des Ang I- und/oder Ang II-Hormonspiegels.

Nguyen et al. (2002) identifizierten in humanen Mesangialzellen einen spezifischen Renin-/Prorenin-Rezeptor (RER). Unter der Verwendung eines Y2H-Systems konnten Schefe et al. (2006) den Transkriptionsfaktor PLZF als direkten Interaktionspartner des RER identifizieren. Die Bindung von Renin an den RER führt zu der Translokation von PLZF in den Zellkern, wo die Transkription des RER reprimiert und gleichzeitig die Transkription der PI3K-p85α induziert wird.

Zwischen der Signalkaskade des AT2R und dem RER könnte eine direkte Wechselwirkung über das Interaktionsprotein PLZF bestehen, das im zytoplasmatischen Raum mit beiden Rezeptoren interagieren kann. Die Stimulation von CHO-K1-Zellen mit Ang II führt nach 3 Minuten zu einer Kolokalisation von PLZF und dem AT2R in der Plasmamembran und nach etwa 3 Stunden zu einer perinukleären Lokalisation des AT2R sowie zu einer

nukleären Lokalisation des Proteins PLZF. Im Nukleus aktiviert PLZF die Transkription der PI3K-p85α (Senbonmatsu et al. 2003).

Konstitutive AT2R-Aktivität

Der AT2R verfügt über eine sogenannte konstitutive Aktivität, da er zelluläre Effekte ohne die Bindung eines Liganden vermitteln kann (Widdop et al. 2008). Rezeptoren, die eine hohe konstitutive Aktivität aufweisen, reagieren nur in geringem Maße auf Agonisten oder Antagonisten (Urban et al. 2007). Miura et al. (2005) konnten mit Hilfe eines *in vitro*-Experiments demonstrieren, dass der AT2R in Fibroblastenzellen und in VSMC bei der Abwesenheit des Liganden Ang II apoptotische Prozesse über seine Signalkaskade vermitteln kann. Diese Effekte wurden durch die Stimulation mit Ang II nicht verändert. Sie konnten weiterhin zeigen, dass die Überexpression des AT2R-Gens in den untersuchten Zellen über den p38 MAPK- und Caspase-3-Signalweg zur Apoptose führt und schlussfolgerten, dass die Liganden-unabhängigen Effekte über die Enzyme p38 MAPK sowie Caspase-3 vermittelt werden, während die Ang II-abhängigen Effekte über den p42/p44 MAPK-Signalweg ablaufen. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Transfektion von neonatalen Kardiomyozytenzellen mit einem zunehmenden AT2R-Titer zur zellulären Hypertrophie führt, die ebenfalls unabhängig von der Bindung der AT2R-Liganden Ang II oder des AT2R-Antagonisten PD123319 war (D'Amore et al. 2005). Falcón et al. (2005) identifizierten mit Hilfe einer Microarray-Expressionsanalyse 5224 Gene, deren Expression durch die konstitutive AT2R-Aktivierung und nicht durch eine AT2R-Ligandenbindung reguliert wird.

Funktionelle Wechselwirkung zwischen dem AT2R und dem AT1R

Der AT1R und der AT2R stehen sowohl auf der Genregulationsebene als auch über die Wechselwirkung mit den gleichen Liganden miteinander in Beziehung (Volpe et al. 2003; De Paolis et al. 1999). Die Aktivierung des AT1R verstärkt die Degradation der AT2R-mRNA. Auf der anderen Seite führt die Stimulation des AT2R zu einem Anstieg der AT2R-Transkription (Volpe et al. 2003). Beide Rezeptoren zeigen ähnliche Affinitäten gegenüber dem Hormon Ang II, wobei Ang II jedoch eine langsamere Internalisierung des AT2R im Vergleich zum AT1R induziert (Griendling et al. 1996).

Mit Hilfe eines Tiermodells zeigten Hiyoshi et al. (2005), dass eine Druckbelastung aufgrund einer Aortenligatur in der Zunahme der vaskulären AT2R-Expression sowie in einer Reduktion der Ang II-vermittelten Effekte durch den AT1R resultiert. Wird der AT1R mit einem AT1R-Antagonisten inhibiert, kommt es zu einem Anstieg des Ang II-Hormonspiegels und gleichzeitig zu einer verstärkten Ang II-Bindung am AT2R. You et al. (2005) wiesen nach, dass die vaskuläre AT2R-Expression bei dauerhafter AT1R-Inhibierung generell erhöht ist. Die Deletion des AT2R führte dagegen zu keiner Änderung der basalen kardialen Funktion und des Remodellingprozesses nach einem Myokardinfarkt (MI)

(Xu et al. 2002). Die Anzahl klinischer Studien, in denen die vaskuläre Funktion des AT2R untersucht wurde, ist stark limitiert. Brillante et al. (2005) zeigten, dass die Administration des AT2R-Antagonisten PD123319 in gesunden männlichen Voluntären keinen Einfluss auf den systemischen vaskulären Widerstand hat. In zwei weiteren Studien führte die Behandlung von gesunden erwachsenen Männern (Gilles et al. 2004) und von älteren Frauen (Phoon and Howes 2002) mit einem AT1R-Antagonisten jedoch zu akuten hämodynamischen Effekten, die auf Aktionen des AT2R zurückgeführt wurden, da sie aus einer kurzzeitigen Behandlung mit PD123319 resultierten.

1.2.2.2 Polymorphismen des AT2R-Gens

In der Literatur werden vier *single nucleotid polymorphisms* (SNPs) für das humane AT2R-Gen beschrieben, die ähnliche Allelfrequenzen besitzen: A1818T in Intron 2, G4303A in Exon 3, A1675G in Intron 1 und C4599A in Exon 3 (Ji et al. 2003). Der intronische Polymorphismus A1675G, der in einigen Publikationen auch -G1332A genannt wird, wurde beispielsweise mit linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) assoziiert (Alfakih et al. 2005; Warnecke et al. 2005; Schmieder et al. 2001).

1.2.2.3 Rolle des AT2R innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen

Ein Schwerpunkt der kardiovaskulären Grundlagenforschung betrifft die Aufklärung der Frage, wie Ang II seine unterschiedlichen Effekte in verschiedenen Geweben vermitteln kann. Im adulten Gewebe ist der AT1R der dominante Rezeptor, im fetalen Gewebe überwiegt dagegen der AT2R. Unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei vaskulären Verletzungen, kommt es jedoch auch im adulten Gewebe zu einer signifikanten Zunahme der AT2R-Expression. Der AT2R fungiert als Gegenspieler vieler AT1R-vermittelter Effekte (Widdop et al. 2003). Aus diesem Grund wird ihm eine Funktion innerhalb der Blutdruckregulation sowie innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben. Diese Rolle wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert.

Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des AT2R in VSMC, Fibroblasten- und Kardiomyozytenzellen antiproliferative Effekte (Stoll et al. 1995) sowie vasodilatorische Effekte (Moore et al. 2001) vermitteln kann und zu einer Verbesserung der kardialen Hypertrophie führt (Falcón et al. 2004). Li et al. (2005) konnten neuroprotektive Effekte des AT2R unter einer AT1R-Inhibierung beobachten. Andererseits haben verschiedene Gruppen die AT2R-Aktivierung als einen Faktor interpretiert, der zur Hypertrophie und kardialen Fibrose beiträgt (Ichihara et al. 2001; Senbonmatsu et al. 2000).

Bei Aufklärung der Funktion des AT2R innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen spielen viele Faktoren eine wichtige Rolle. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die AT2R-vermittelten Effekte beispielsweise von der Präsenz sowie vom Typ des jeweiligen AT2R-Interaktionspartners, PLZF oder ATIP1, abhängig sind. Ein weiterer Aspekt betrifft

die Tatsache, dass diese Effekte oft im Hintergrund von Aktionen des AT1R ablaufen. Dieses hat insbesondere experimentelle Bedeutung, da AT2R-Aktionen verborgen bleiben, solange der AT1R nicht inhibiert wird (You et al. 2005). Seine geringe Expression im adulten Gewebe erschwert zusätzlich die Untersuchung des AT2R innerhalb kardialer Erkankungen. Der bisher verfügbare pharmakologische AT2R-Antagonist PD123319 verliert seine Selektivität, wenn er in hohen Dosen verabreicht wird und führte daher zu widersprüchlichen *in vivo*-Ergebnissen (Macari et al. 1993). 2004 wurde mit Compound 21 (Comp21) der erste selektive, nichtpeptidische AT2R-Agonist synthetisiert. Kaschina et al. (2008) zeigten erstmals in einem Tiermodell, dass eine direkte AT2R-Stimulation mit Comp21 nach der Induktion eines Myokardinfarkts sowohl die systolische als auch die diastolische ventrikuläre Funktion signifikant verbessert.

1.2.3 AT2R-*binding*-Protein

Wruck et al. (2005) identifizierten das AT2R-*binding*-Protein (ATBP) als zytoplasmatischen C-terminalen Interaktionspartner des AT2R. Das murine ATBP-Gen ist auf Chromosom 8 lokalisiert und kodiert für die drei Isoformen: ATBP50 (50 kDa), ATBP60 (60 kDa) und ATBP135 (135 kDa). Die Familie des äquivalenten humanen ATIP kann in folgende drei Mitglieder untergliedert werden: ATIP1, ATIP3 und ATIP4 (Nouet et al. 2004). Das ATIP3-Transkript umfasst wiederum drei alternative Spleißvarianten: ATIP2, ATIP3a und ATIP3b (Di Benedetto et al. 2006). Es wird ubiquitär exprimiert und ist wie das murine Gen auf Chromosom 8 lokalisiert. Alle ATIP- beziehungsweise ATBP-Proteine verfügen über ein großes *coiled-coil*-Motiv, über das sie mit dem C-terminalen Ende des AT2R-Gens interagieren können. Sie sind außerdem in der Lage Dimere zu bilden. Das murine Protein ATBP50 beziehungsweise das humane Protein ATIP1 spielen bei der Interaktion mit dem AT2R eine Schlüsselrolle. In der Abbildung 1.5 ist die Struktur des murinen ATBP-Gens schematisch dargestellt (nach Wruck et al. (2005)).

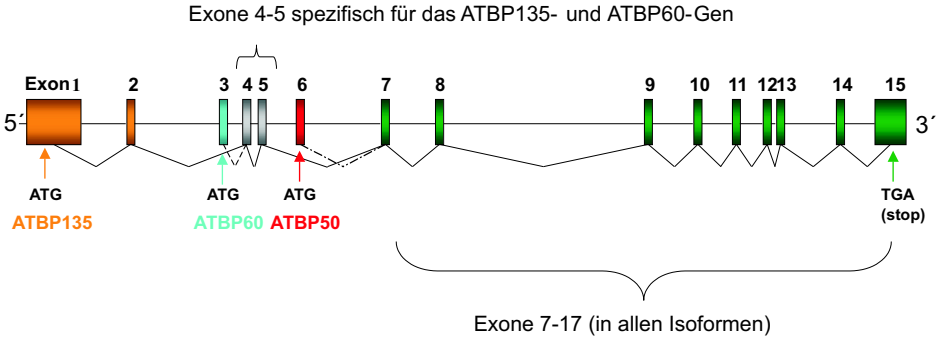


Abbildung 1.5: Darstellung der ATBP-Genstruktur. Das ATBP-Gen besteht aus 15 Exonen und ist auf Chromosom 8 lokalisiert. Alle Isoformen enthalten die Exone 7 bis 15 (grün). Das Exon 6 ist isoformspezifisch für das ATBP50-Gen (rot). Die Isoformen ATBP60 und ATBP135 verfügen über die Exone 4 und 5 (grau). Das Exon 3 ist spezifisch für das ATBP60-Gen (blau) und die Exone 1 und 2 sind isoformspezifisch für das ATBP135-Gen (orange).

Datenbankanlaysen der genomischen Sequenzen zeigen, dass sowohl die vier humanen ATIP-mRNAs als auch die drei murinen ATBP-mRNAs jeweils von einem Gen transkribiert werden und über einen alternativen Promotor sowie durch alternatives Spleißen synthetisiert werden. Alle drei ATBP-Isoformen enthalten die Exone 7 bis 15. Das ATBP50-Transkript verfügt als einzige Isoform über das Exon 6. Die Exone 4 und 5 sind spezifisch für die Isoformen ATBP60 und ATBP135. Das ATBP60-Gen besitzt zusätzlich das Exon 3 und das ATBP135-Gen die Exone 1 und 2.

Das ATIP/ATBP-Protein enthält eine *coiled-coil*-Domäne, die wiederum zwei *leucin-zipper*-Motive umfasst. Die C-terminalen Sequenzen sind bei allen vier ATIP- und allen drei ATBP-Mitgliedern identisch, einschließlich der *coiled-coil*-Domäne, der *leucin-zipper*-Motive sowie eines Bereichs von 118 AS, der mit dem AT2R interagiert. Im N-Terminus unterscheiden sich die ATIP-/ATBP-Proteine sowohl hinsichtlich ihrer Länge als auch in ihrer Sequenz voneinander. Sie weisen hier isoformspezifische Motive auf, die auf eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation hindeuten und/oder auf die Assoziation mit verschiedenen zytosolischen Partnern (Nouet et al. 2004). Die Abbildung 1.6 zeigt den schematischen Aufbau der ATBP-Proteinfamilie (nach Wruck et al. (2005)).

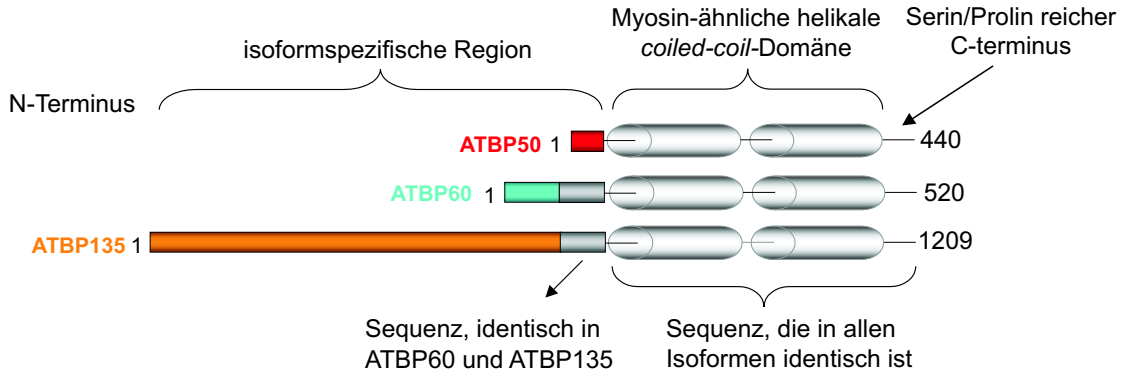


Abbildung 1.6: Bioinformatisch prognostizierte Sekundärstruktur der ATBP-Proteinfamilie. Die drei Isoformen ATBP50, ATBP60 und ATBP135 verfügen jeweils über eine Myosin-ähnliche helikale *coiled-coil*-Domäne, unterscheiden sich jedoch im N-terminalen Bereich.

Die Interaktion des Proteins ATBP50 beziehungsweise ATIP1 mit dem C-Terminus des AT2R resultiert in der Translokation des AT2R vom Golgi-Apparat in die Zellmembran (Wruck et al. 2005). Diese Wechelwirkung vermittelt zusätzlich inhibierende Effekte auf die MAP-Kinasen ERK1/2 sowie antiproliferierende Effekte in murinen N1E-115-Neuroblastomazellen.

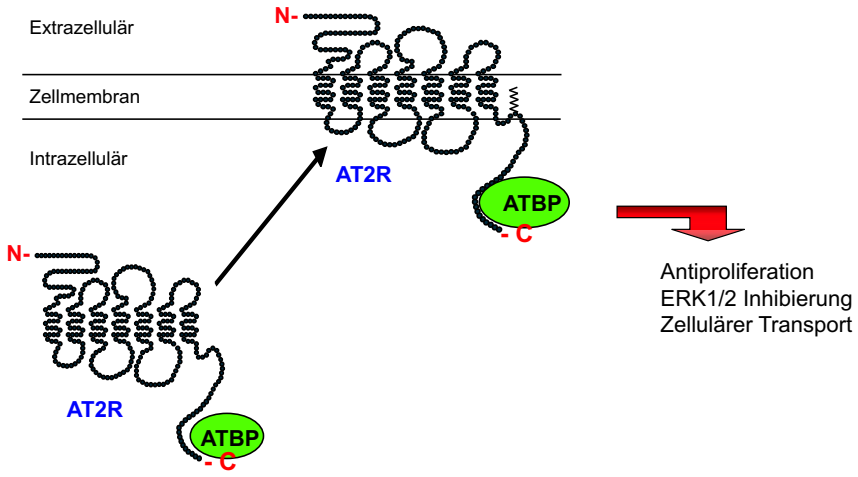


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Interaktion des AT2R mit dem Protein ATBP50.

1.3 Östrogene

Östrogene gehören zu den weibliche Sexualhormonen, die in heranreifenden Follikeln in den Ovarien produziert werden. Sie spielen bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der sexuellen und reproduktiven Funktion eine wichtige Rolle, sind aber auch in die Geweberegulation innerhalb und außerhalb des Geschlechtssystems involviert. Bei Frauen bewirkt das Hormon 17β-Östradiol (E2) zu Beginn des Menstruationszyklusses den Aufbau der Gebärmutterschleimhaut, der mit der Bildung neuer Blutgefäße, der Verdickung des Endometriums und dem Aufbau der Schleimhautdrüsen einhergeht. Am 14. Tag der Proliferationsphase erreicht der Östrogenspiegel im Blut eine Konzentration von etwa 1332-5290 pg/ml (Turner and Wass 2002), die zur Inhibierung des in der Hypophyse produzierten follikelstimulierenden Hormons (FSH) und zu einer Aktivierung des ebenfalls in der Hypophyse synthetisierten luteinisierenden Hormons (LH) führen.

Östrogene lassen sich in steroidale und nicht-steroidale Formen klassifizieren und können weiterhin in natürliche und synthetische Östrogene unterteilt werden (Stanczyk 1991). Zu den nicht-steroidalen Östrogenen gehören beispielsweise Phytoöstrogene. Im menschlichen Körper existieren drei natürliche Östrogenderivate: das 17β-Östradiol (E2), das Östriol sowie das Östrogensulfat. Die Sekretion von E2 ist vom Vorhandensein der Follikel abhängig. Der Verlust der Follikel während der Menopause resultiert in einer starken Abnahme der Östrogenproduktion (Steiner 2009). Östrogene umfassen eine Gruppe von strukturell verwandten, hormonell aktiven Molekülen, die Signalkaskaden regulieren und unter anderem Einfluss auf die Zellproliferation, Differenzierung oder auf die metabolische Homöostase ausüben können (Ropero et al. 2008). Die Östrogensignalkaskade ist daher im Fokus vieler pharmakologisch therapeutischer Ansätze, da sie mit Hilfe von spezifischen Medikamenten selektiv stimuliert oder inhibiert werden kann. Molekularbiologische und strukturelle Studien haben die Entwicklung von selektiven und effektiven ER-Liganden ermöglicht. So können zum Beispiel selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) gleich-

zeitig als Östrogenagonisten beziehungsweise Östrogenantagonisten wirken (Kung et al. 2009). Beispielhaft sei hier das Raloxifen genannt, das bei der post-menopausalen Hormontherapie oder bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird.

1.3.1 Die Östrogenrezeptoren α und β

Östrogene vermitteln ihre Wirkung über zwei Rezeptoren: den Östrogenrezeptor α (ERα) und den Östrogenrezeptor β (ERβ). Für den humanen ERα sind zwei und für den humanen ERβ vier Spleißvarianten bekannt (Kuiper et al. 1997). Die beiden Rezeptoren sind Produkte unterschiedlicher Gene, die wiederum auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Der ERα dominiert im Hypothalamus und in den Ovarien. Der ERβ wird in den Ovarien, den Testis, der Prostata, dem Gastrointestinaltrakt, dem Gefäß- und Skelettsystem sowie im Gehirn exprimiert. Beide Östrogenrezeptoren (ER) gehören zu der Familie der nukleären Rezeptoren, die als Liganden-aktivierbare Transkriptionsfaktoren agieren und auf diese Weise die Expression sowie die Synthese anderer Gene beziehungsweise Proteine regulieren. Zu weiteren bekannten nukleären Rezeptoren gehören beispielsweise Rezeptoren der Glukokortikoide, Thyroidhormone, Retinoide, Vitamin D3 und Eikosinoide. Wie auch die anderen Mitglieder dieser Rezeptorfamilie verfügen die Östrogenrezeptoren über evolutionär konservierte Domänen (Ruff et al. 2000).

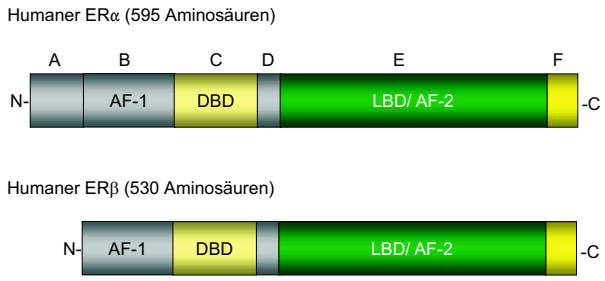


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der Östrogenrezeptoren α (ERα) und β (ERβ). Beide Rezeptoren verfügen über eine DNA-bindende Domäne (DBD, Domäne C), eine Ligandenbindungsdomäne (LBD, Domäne E) sowie die beiden transkriptionell aktivierenden Funktionsdomänen 1 und 2 (AF-1, Domäne A/B und AF-2, Domäne E). Die Domänen C/D verfügen über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS).

Die zentrale Domäne beider Rezeptoren ist die DNA-bindende Domäne (DBD, Domäne C). Sie enthält ein P-Box-Motiv, das in die DNA-Erkennung, Bindung sowie in die ER-Dimerisierung involviert ist. Die Domäne D ist im Gegensatz zu der P-Box weniger konserviert. Sie verfügt über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), das in die Domäne C hineinragt. Die Bindung des Liganden erfolgt an der konservierten C-terminalen, multifunktionellen Ligandenbindungsdomäne (LBD) über eine Hormonbindungsstelle. Die N-terminale Domäne ist dagegen weniger konserviert und kann sowohl in der Sequenz als auch in der Länge variieren. Die transkriptionsregulierende Funktion wird durch zwei verschiedene aktivierende Funktionsdomänen (AF) vermittelt. Die konstitutiv aktive AF-1-Domäne befindet sich am N-Terminus des Rezeptors (Domäne A/B). Die Ligandenabhängige AF-2-Domäne ist in der C-teminalen Domäne LBD lokalisiert. Beide AF-Domänen rekrutieren regulative Proteinkomplexe an den DNA-gebundenen Rezeptor, wie zum Beispiel die p160-Koaktivatorfamilie (Edwards 2000). Die beiden Östrogenrezeptoren verfügen über eine große Sequenzhomologie, mit Ausnahme der N-terminalen Domäne, und ähnliche Affinitäten für das Hormon E2. Zwischen beiden Rezeptoren besteht für die DBD etwa 94% und für die LBD etwa 59% Sequenzhomologie. Sie binden außerdem ein gleiches

DNA-Element, das sogenannte östrogenresponsive Element (ERE), das die Konsenssequenz 5'-AGGTCA(N)$_3$TGACCT-3' besitzt (Gustafsson 2003).

1.3.2 Signalkaskaden der Östrogenrezeptoren

Östrogene und Östrogenrezeptoren können biologische Prozesse über verschiedene Signalkaskaden regulieren (Hall et al. 2001). Die Bindung eines Liganden an die ER resultiert in einer Konformationsänderung, welche die Rezeptoraktivität und somit die Interaktion mit anderen Proteinen und der DNA reguliert. Die Wechselwirkung initiiert die Expression beziehungsweise Repression von Genen über nukleäre und/oder extranukleäre Kaskaden. Die Kombination der Wirkungsmechanismen von Östrogenen hängt hauptsächlich vom Zell- beziehungsweise Gewebetyp ab (Song and Santen 2006).

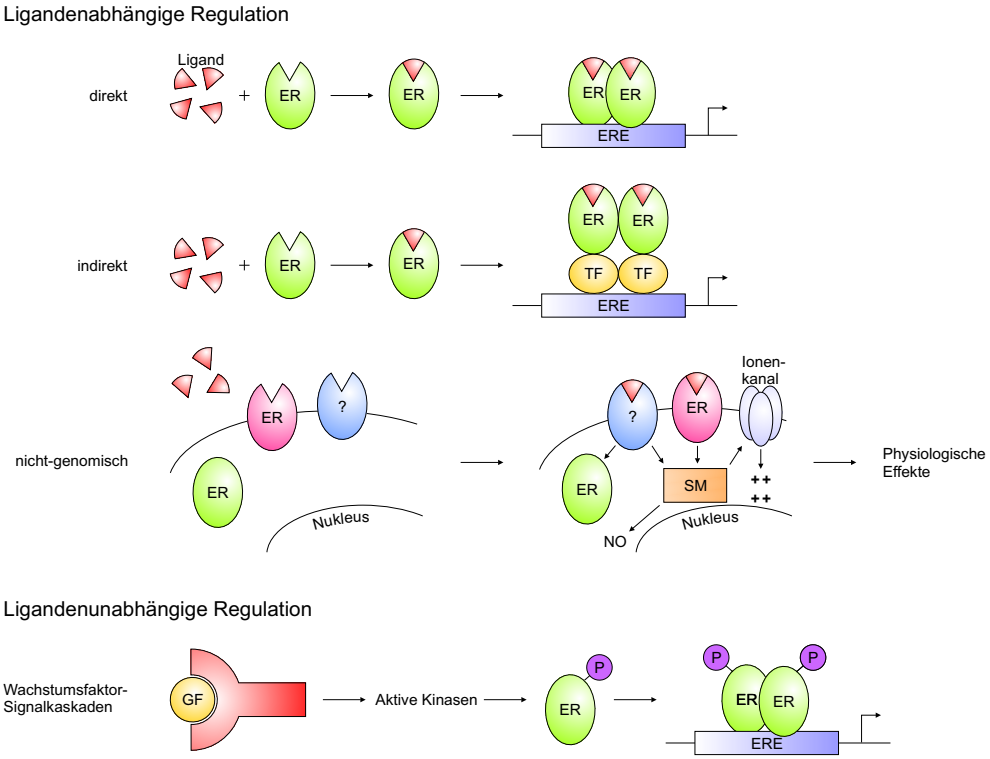


Abbildung 1.9: Signalkaskaden des ERα und ERβ. Die direkte Signalkaskade beinhaltet die Bindung von Liganden an die ER, woraufhin diese dimerisieren und direkt an östrogenresponsible Elemente (ERE) der DNA binden. Bei der indirekten Signalkaskade gehen die ER nach der Ligandenbindung Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionfaktoren ein, die anschließend mit der DNA wechselwirken. Kurzzeitige Effekte werden durch eine sogenannte "nicht-genomische" Signalkaskade vermittelt. Dabei wird der Rezeptor durch Liganden aktiviert, wahrscheinlich über Interaktionen mit der Zellmembran. Es kann sich dabei um einen klassischen ER (Deecher et al. 2003), eine ER-Isoform (Li et al. 2003) oder einen anderen Rezeptor (Doolan and Harvey 2003) handeln. Diese Kaskade wird über *second*-Messengers (SM) propagiert, die einen Effekt auf Ionenkanäle ausüben oder die Stickstoffmonoxidkonzentration (NO) im Zytoplasma erhöhen. Die Regulation über die DNA von Genen ist bei diesem Prozess nicht involviert. Die ligandenunabhängige Signalkaskade wird durch die Aktivierung anderer Kaskaden induziert, beispielsweise durch die Signalkaskade der Wachstumsfaktoren (GF). Bei dieser Interaktion phosphoryliert eine aktivierte Kinase die ER, woraufhin diese dimerisieren und an das ERE der DNA binden können.

Die Abbildung 1.9 zeigt die Mechansimen der unterschiedlichen ER-Kaskaden (Abbildung nach Heldring et al. (2007)). Bei der ligandenabhängigen Regulation bewirkt die Bindung eines Liganden am ER eine Konformationsänderung, woraufhin dieser dimerisiert und über *zinc-finger*-Motive der DBD an palindromische EREs der Promotoren von Zielgenen binden kann und somit die Transkription induziert (Kuiper et al. 1997). Ein alternativer Mechanismus der Genexpression ist die Wechselwirkung über Protein-Protein-Interaktionen von ligandengebundenen ER mit Transkriptionsfaktoren, beispielsweise mit Fos/Jun oder SP-1 (Saville et al. 2000). In diesem Fall binden die ER nicht direkt an die Promotor-DNA. Neben den transkriptionellen Effekten von Östrogenen hat das Hormon auch sehr kurzzeitige regulatorische Wirkungen, die innerhalb von Sekunden oder Minuten ablaufen (Song and Santen 2006). Die kurzzeitige Wirkung beruht auf der Aktivierung von Kinasen, Phosphatasen oder *scaffold*-Molekülen sowie auf einen erhöhten Ionenfluss durch die Membranen. Neben der ligandeninduzierten transkriptionellen Aktivität der ER, sind ligandenunabhängige Signalwege beschrieben, welche die ER aktivieren können. So führen zum Beispiel Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung von Kinasen, welche wiederum die ER phosphorylieren, die daraufhin an EREs von Promotoren der Zielgene binden können (Kato et al. 1995).

1.3.3 Einfluss von Östrogenen auf den AT2R

Hypertonie gehört zu den Hauptrisikofaktoren bei der Entstehung koronarer Herzerkrankungen, Schlaganfall und renalen Erkrankungen. Bluthochdruck tritt bei Männern und Frauen auf, wobei geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet werden können (Ramirez-Exposito and Martinez-Martos 2008). Männer entwickeln Bluthochdruck im Vergleich zu Frauen zu einem früheren Zeitpunkt (Regitz-Zagrosek 2006). Mit Hilfe einer ambulanten 24-Stunden-Blutdruckmessung konnte gezeigt werden, dass der Blutdruck bei Männern verglichen mit prä-menopausalen Frauen des gleichen Alters signifikant erhöht ist (Wiinberg et al. 1995; Khoury et al. 1992). Die unterschiedliche Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Männern und Frauen wird mit dem günstigen Einfluss von Östrogenen auf das Herzkreislaufsystem in Zusammenhang gebracht (Choi and McLaughlin 2007). Post-menopausale Frauen leiden im Vergleich zu gleichaltrigen Männern dagegen häufiger an Hypertonie (Cheung et al. 2006), kardiovaskulären Erkrankungen, Myokardinfarkt oder Herzversagen (Thom et al. 2006). Einige Studien zeigen jedoch, dass die zunehmende Prävalenz von Bluthochdruck und kardiovaskulären Erkrankungen bei post-menopausalen Frauen möglicherweise durch Alterungsprozesse und nicht durch einen Östrogenmangel verursacht wird (Sjöberg et al. 2004). Die geschlechtsspezifische Regulation des Blutdrucks wurde zusätzlich in verschiedenen hypertensiven Rattenmodellen untersucht (Reckelhoff et al. 2000; Crofton et al. 1993). Innerhalb dieser Versuche zeigten die männlichen Tiere im Vergleich zu den weiblichen Tieren jeweils einen höheren Blutdruck (De la Chica et al. 2007).

Das lokale und das zirkulierende RAS sind in die Pathogenese des Bluthochdrucks involviert. In einer klinischen Studie von Miller et al. (1999) konnte gezeigt werden, dass eine Infusion mit Ang II bei gesunden normotensiven Männern und Frauen zu einer vergleichbaren Zunahme des Blutdrucks führt. Untersuchungen im Tiermodell von Armando et al. (2002) beziehungsweise von Suarez et al. (2004) haben zu dem Ergebnis geführt, dass Östrogene das Verhältnis des AT1R respektive AT2R zu Gunsten des AT2R verschieben. Baiardi et al. (2005) untersuchten die Expression des renalen AT1R und AT2R in männlichen, weiblichen, ovarektomierten und ovarektomierten-östrogenbehandelten Ratten. Sie zeigten, dass die Expression des AT2R in den Nieren von adulten männlichen Ratten verglichen mit weiblichen Tieren signifikant reduziert ist und dass die Expression des AT1R und AT2R östrogenabhängig erfolgt. Die Behandlung der ovarektomierten Tiere mit E2 resultierte in einer signifikanten Zunahme der Expression des AT1R und des AT2R. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte demonstrieren, dass die Behandlung mit dem AT1R-Antagonisten Losartan die AT2R-mRNA-Expression in mesentrischen Arterien von weiblichen spontanen hypertensiven Ratten aktiviert, nicht aber die Expression in den Arterien männlicher Tiere (De Rodrigues et al. 2006).

Ein genetischer Polymorphismus in der 3'-untranslatierten Region (UTR) des AT2R-Gens moduliert den linksventrikulären Massenindex in Frauen mit hypertropher Kardiomyopathie. Dieser Effekt wird in männlichen Patienten nicht beobachtet (Deinum et al. 2001). In einer weiteren Studie wurde der AT2R-Polymorphismus C4599A, der im Exon 3 lokalisiert ist, mit Hypertonie in Frauen, aber nicht in Männern assoziiert (Ji et al. 2003). In verschiedenen Studien wurde das A-Allel des sich im Intron 1 befindenden AT2R-Polymorphismus -G1332A mit linksventrikulärer Hypertrophie in Männern und koronarer Ischämie in Frauen assoziiert (Warnecke et al. 2005).

1.4 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 und Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Die Existenz von Poly(ADP-Ribose)-Molekülen im Zellkern von Säugern wurde zum ersten Mal 1963 von Chambon und Kollegen beschrieben (Chambon et al. 1963). In den letzten Jahren rückte die Proteinfamilie PARP erneut in den Fokus der Forschung. Der Grund liegt in dem Zuwachs an Erkenntnissen über die biochemischen Aspekte der Poly(ADP-Ribosyl)ierung. Diese spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, beispielsweise bei der inter- und intrazellulären Signalübertragung, der Transkription, der Erkennung sowie Reparatur von DNA-Schäden, der Regulierung des Zellzyklusses, der Nekrose und Apoptose (Virág and Szabó 2002). Seit den 90er Jahren haben pharmazeutische Unternehmen mit der Entwicklung von selektiven PARP-Inhibitoren begonnen, deren Haupteinsatzgebiete unter anderen die Therapie des Schlaganfalls und kardiovaskulärer Erkrankungen sind.

PARPs sind Enzyme, die Poly(ADP-Ribose)-Ketten an Zielproteine polymerisieren. Sie nutzen das Koenzym NAD^+ als Substrat und synthetisieren daraus schrittweise ein Homopolymer aus ADP-Ribose-Einheiten. Die humane PARP-Familie umfasst insgesamt 18 verschiedene Proteine (Ame et al. 2004). Alle Mitglieder enthalten eine konservierte katalytische Domäne, das sogenannte PARP-Motiv (Rolli et al. 2000). Der weitere Aufbau der PARP-Proteine beinhaltet zwei *zinc-finger*-Motive, das "BRCA1 C-Terminus-ähnliche" (BRCT)-Motiv, Ankyrinwiederholungen sowie Makro- und WWE-Domänen. Diese sind in unterschiedlicher Anzahl und Kombination vertreten und tragen zu den spezifischen Eigenschaften der jeweiligen PARP-Proteine bei.

Das am besten charakterisierte Protein dieser Familie ist PARP-1. Es ist ein evolutionär hochkonserviertes Enzym mit einer charakteristischen Struktur (siehe Abbildung 1.10). Es enthält am N-Terminus zwei *zinc-finger*-Motive (DBD). Daneben besitzt PARP-1 ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), eine zentrale Automodifikations-Domäne (BRCT) und am C-Terminus eine katalytische Domäne (Rolli et al. 2000).

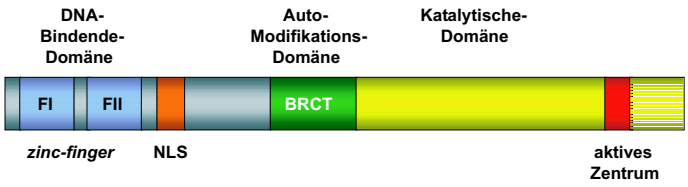


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der PARP-1-Proteinstruktur. Es enthält am N-Terminus zwei *zinc-finger*-Motive (DBD) und verfügt zusätzlich über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), eine Automodifikations-Domäne (BRCT) sowie eine katalytische Domäne, die das aktive Zentrum enthält.

PARP-1 ist ein ubiquitär exprimiertes nukleäres Enzym, dass die NAD^+-abhängige Addition von ADP-Ribose-Polymeren auf Zielproteine überträgt. Die katalytisch aktive Form von PARP-1 ist ein Homodimer (Virág and Szabó 2002). Es bindet sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA-Strukturen. Die intrinsische enzymatische Aktivität von PARP-1 ist sehr niedrig, wird aber durch die Präsenz allosterischer Aktivatoren, zum Beispiel durch geschädigte DNA oder Nukleosomen, stimuliert (Kim et al. 2004). Die enzymatische Aktivität von PARP-1 wird durch den physiologischen Zustand der Zelle bestimmt, der von der NAD^+-Konzentration und den genomischen Bedingungen abhängt (Kraus 2008). Das *linker*-Histon H1 oder Transkriptionsfaktoren gehören zu den nukleären Zielobjekten der enzymatischen Aktivität von PARP-1 (D'Amore et al. 2005). Das wichtigste Akzeptorprotein für die ADP-Ribose-Polymere ist PARP-1 selbst (Kraus and Lis 2003).

Neben seiner enzymatischen Funktion ist PARP-1 zusätzlich in die transkriptionelle Regulation von Zielgenen involviert und kann als transkriptioneller Koaktivator oder als Repressor fungieren (Meisterernst et al. 1997; Kraus and Lis 2003). PARP-1 modifiziert Histone und erzeugt eine anionische poly(ADP-Ribose)-Matrix, die Histone bindet und die Dekondensation von *higher-order*-Chromatinstrukturen begünstigt (Kraus and Lis 2003). Daneben kann PARP-1 die Transkription als Komponente von *enhancer*- und/oder Promotorkomplexen beeinflussen (Schreiber et al. 2006). Die Aktivität von PARP-1 an *enhancern* oder Promotoren wird durch die Interaktion von PARP-1 mit verschiedenen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren einschließlich NFκB, Oct-1 oder nukleären Rezeptoren bedingt (Anderson et al. 2000).

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Bei der Poly(ADP-Ribosyl)ierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, die durch PARPs vermittelt wird. Bei Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen katalysieren sie die kovalente Bindung von ADP-Ribose-Einheiten vom Substrat NAD^+ auf die γ-Carboxylgruppe von Glutaminsäureresten der Akzeptorproteine. Bei der Poly(ADP-Ribosyl)ierung werden ein oder mehrere ADP-Ribosereste an Proteine angefügt. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung spielt bei der Zellkommunikation und bei der Kontrolle zellulärer Prozesse, einschließlich DNA-Reparatur und Apoptose eine wichtige Rolle. In der Folge von DNA-Strangbrüchen kommt es zu einem 500-fachen Anstieg der katalytischen Aktivität von PARP-1. In der Abbildung 1.11 ist der Prozess der Poly(ADP-Ribosyl)ierung schematisch dargestellt.

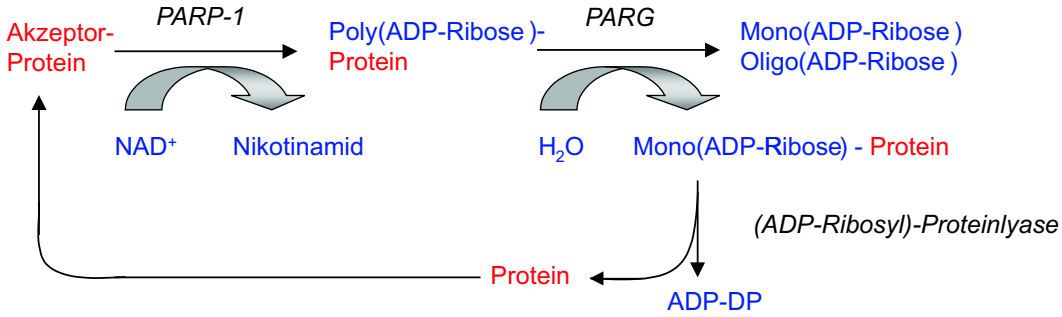


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung eines Akzeptorproteins. PARP-1 katalysiert die Polymerisation der (ADP-Ribose)-Einheiten von dem Substrat NAD^+ auf ein Zielprotein. Anschließend katalysiert das Enzym Poly(ADP-Ribosyl)-Glykohydrolase (PARG) die Hydrolyse von Poly(ADP-Ribose) (PAR), wodurch freie Mono- und Oligo(ADP-Ribose) entsteht. Die (ADP-Ribosyl)-Proteinlyase spaltet das finale (ADP-Ribose)-Monomer vom Zielprotein. Dabei entsteht ADP-3'-deoxypentose-2'-ulose (ADP-DP).

Die Proteinmodifikation der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wird von den Enzymen PARP und der Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG) katalysiert. PARPs übertragen (ADP-Ribose)-Einheiten auf den Aminosäurerest der Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure oder Lysin eines Akzeptorproteins und können lange Poly(ADP-Ribose)-Ketten aufbauen. Die Reaktion läuft innerhalb von Minuten ab und bewirkt durch das Einführen negativer Ionenladungen eine gravierende Veränderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Proteins. Die Poly(ADP-Ribose) hat jedoch nur eine kurze Halbwertszeit von etwa 1 min (Alvarez-Gonzalez and Althaus 1989). Sie wird durch das im Zellkern lokalisierte Enzym PARG zu freier ADP-Ribose abgebaut.

1.4.1 Einfluss von PARP-1 auf den AT2R

Die Aktivierung von PARP-1 ist in die Pathogenese der akuten und chronischen myokardialen Dysfunktion involviert. Die Aktivierung von PARP-1 trägt beispielsweise zu der Entwicklung von Ang II-induzierter endothelialer Dysfunktion bei (Szabó et al. 2004). Dieser Effekt konnte durch die Behandlung mit dem AT1R-Antagonisten Losartan inhi-

biert werden. In Kardiomyozyten- und Endothelzellen kommt es während der myokardialen Ischämie, des Herzversagens oder der Kardiomyopathie zu der Erzeugung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffmolekülen (Pacher and Szabó 2007). Diese reaktiven Moleküle induzieren eine oxidative Schädigung der DNA, woraufhin PARP-1 aktiviert wird. Die pharmakologische Inhibierung von PARP hat in Tierexperimenten zu einer signifikanten Verbesserung von kardiovaskulären Erkrankungen beigetragen. Molnár et al. (2006) konnten in einem Tiermodell zeigen, dass PARP-Inhibitoren die Aktivierung von PARP in Ang II-behandelten Tieren blockieren. In PARP-1-Wildtyp-Mäusen führte die Behandlung mit Ang II im Vergleich zu homozygoten PARP-1-*knockout*-Tieren zu einer signifikanten Zunahme des Verhältnisses Herzgewicht zu Herzlänge sowie zur Entwicklung von Fibrose (Pillai et al. 2006). Eine direkte Interaktion zwischen PARP-1 und dem AT2R ist bisher jedoch nicht bekannt.

2 Ziel der Arbeit

Die Rolle des AT2R innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zwar wird vermutet, dass er als Antagonist der AT1R-vermittelten Effekte eine positive physiologische Funktion hat, gleichzeitig gibt es jedoch Hinweise, dass der AT2R selbst zur Hypertrophie beiträgt. Die Klärung dieses Sachverhaltes ist herausfordernd, da die AT2R-Signalkaskade und ihre Wirkung beispielsweise aufgrund der geringen endogenen AT2R-Expression nur schwer experimentell zu belegen ist. Bekannt ist, dass der AT2R im fötalen Gewebe im Vergleich zum AT1R der dominierende Rezeptor ist. In der postnatalen Phase nimmt seine Expression dramatisch ab und wird nur noch von wenigen Geweben exprimiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen steigt seine Expression jedoch auch im adulten Organismus erneut an.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Identifikation und Aufklärung transkriptioneller, genregulatorischer Mechanismen des AT2R und seines zytoplasmatischen Interaktionspartners, dem humanen Protein ATIP1 beziehungsweise dem murinen ATBP50. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit befasst sich daher mit der Charakterisierung der Promotorstruktur und -aktivität dieser Gene. Die Aufgabe beinhaltet die Ermittlung der transkriptionellen Startpunkte sowie die Charakterisierung der Promotoren beider Gene unter basalen Bedingungen.

Östrogene scheinen das Verhältnis der AT1R/AT2R-Expression zu Gunsten des AT2R zu verschieben. Untersuchungen von Polymorphismen des AT2R-Gens weisen darauf hin, dass der AT2R einen protektiven Effekt bei der myokardialen Hypertrophie von Frauen ausübt. Der mögliche Einfluss von Sexualhormonen auf die Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens ist jedoch weitestgehend ungeklärt. Vor diesem Hintergrund wird in dieser Arbeit der Einfluss des weiblichen Sexualhormons 17β-Östradiol auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens auf der Promotorebene untersucht. Diese Studien werden durch Untersuchungen der mRNA-Expression der beiden Zielgene im Herzen gesunder Ratten und in humanen Herzgewebeproben von gesunden Spendern komplementiert.

Das Protein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 ist in die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen involviert. Tierexperimente haben gezeigt, dass homozygote PARP-1-*knock-out*-Tiere nach der Induktion mit Ang II weder kardiale Hypertrophie noch endotheliale Dysfunktionen entwickeln. Die regulativen Mechanismen dieser RAS-PARP-Interaktion sind bisher unbekannt. Daher soll im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss von PARP-1 auf die Transkription des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens auf der mRNA-, Promotor- und Chromatinebene analysiert werden. Die Untersuchungen werden auf der mRNA-Ebene mit Hilfe der *real-time*-PCR, auf Promotorebene mittels Reporterassays und auf der Chromatinebene durch die Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antikörper

- Polyklonaler Kaninchen *anti*-MMP-2 (H-76) Antikörper sc-10736
  (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Monoklonaler Maus *anti*-PARP-1 (F-2) Antikörper sc-8007
  (Santa Cruz Biotechnology)
- Polyklonaler Ziege *anti*-Pol II (C-18) Antikörper sc-5943
  (Santa Cruz Biotechnology)
- Polyklonaler Kaninchen *anti*-TIMP-1 (H-150) Antikörper sc-5538
  (Santa Cruz Biotechnology)
- Polyklonaler Kaninchen *anti*-TIMP-3 (H-55) Antikörper sc-30075
  (Santa Cruz Biotechnology)
- Polyklonaler Kaninchen *anti*-TFIID (TBP) (N-12) Antikörper sc-204
  (Santa Cruz Biotechnology)

3.1.2 Bakterienstämme

- XL1-*blue* chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterienzellen
  (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
  Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB* $lacI^qZ\Delta M15$ Tn*10* (Tet^r)]
- *One shot* TOP10F' chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterienzellen
  (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
  Genotyp: *recA1 endA1 galU galK rpsL nupG mcrA* Δ*(mrr-hsdRMS-mcrBC)* Φ*80lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74 araD139* Δ*(araleu)7697* [F' $lacI^q$ Tn*10* (Tet^r)]

3.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind im Anhang in der Tabelle A.1 aufgelistet.

3.1.4 Enzyme

- Restriktionsendonukleasen Hind*III*, Kpn*I*, XhO*I*, EcoR*I* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)
- T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim, Deutschland)
- M-MLV-Reverse-Transkriptase (Promega)
- RQ1-RNase-Free DNase (Promega)

3.1.5 Größenstandards

- *GeneRuler* 50 bp DNA *ladder* (Fermentas)
- *GeneRuler* 100 bp DNA *ladder* (Fermentas)
- *GeneRuler* 1 kb DNA *ladder* (Fermentas)

3.1.6 *Kits*

- *GeneRacer-Kit* (Invitrogen)
- *Dual-luciferase-reporter-assay*-System (Promega)
- *HotStarTaq-PCR-Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- *NucleoSpin-Extract-II* (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
- *NucleoSpin-RNA-II* (Macherey-Nagel)
- *NucleoSpin-Plasmid-QuickPure* (Macherey-Nagel)
- pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA-Expressionsvektor (Invitrogen)
- *Plasmid-DNA-Purification-NucleoBond-Xtra-Mini* (Macherey-Nagel)
- *Plasmid-DNA-Purification-NucleoBond-Xtra-Midi* (Macherey-Nagel)

3.1.7 Medien für die Bakterienkultur

- **LB-Medium:**
  1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl, (pH 7,2); autoklaviert (121 °C, 20 Minuten)
- **SOC-Medium:**
  2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 8,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$ (pH 7,0); autoklaviert (121 °C, 20 Minuten), 2% (v/v) 1 M Glucoselösung

- **LB-Agar:**
  LB-Flüssigmedium; 20 g/l Agar; autoklaviert (121 °C, 20 Minuten)

3.1.8 Wirkstoffe für die Stimulationsexperimente

- Angiotensin II (Ang II); 0,1 mM in Wasser (Sigma, Hamburg, Deutschland)
- 3-Aminobenzamid (3-AB); PARP-Inhibitor; 10 mM in DMSO/PBS bei der Stimulation von EA.hy926-Zellen; 30 mM in DMSO/PBS bei der Stimulation in KELLY-Zellen (Sigma)
- Compound 21; AT2R-Agonist; 1 mM in Wasser (Vicore Pharma, Göteborg, Schweden)
- 17β-Östradiol (E2); 10 nM in Ethanol (Sigma)
- 17β-Östradiol (E2); 10 nM in Wasser (Sigma)
- Irbesartan (Irb); AT1R-Antagonist; 10 mM in DMSO/PBS (Sigma)

3.1.9 Primer

- Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des humanen AT2R-Gens: siehe Anhang Tabelle A.3
- Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des humanen ATIP1-Gens: siehe Anhang Tabelle A.4
- Primer der RLM-5'-RACE und Luziferase-RLM-5'-RACE:
  siehe Anhang Tabelle A.5
- Primer für die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP):
  siehe Anhang Tabelle A.6
- Primer für die Expressionsanalyse:
  siehe Anhang Tabellen A.7 sowie A.8

3.1.10 Puffer

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Puffer mit H_2O-bidest angesetzt.

- 6× Probenpuffer (DNA-Agarosegelelektrophorese): 40% (w/v) Saccharose, 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- 50× TAE-Puffer (DNA-Agarosegelelektrophorese): 2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,05 M EDTA, pH 8,0

- Lysepuffer (ChIP): 1% SDS, 4 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 1× Complete Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland), pH 8,1
- Sepharose-Puffer (ChIP): 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,1% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) NaN_3
- TE-Puffer (ChIP): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
- 1 M Tris-HCl-Puffer (ChIP): 1 M Tris-HCl, pH 7,5
- TSE-150 Puffer (ChIP): 1% Triton-X-100, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,1
- LiCl-Puffer (ChIP): 0,25 M LiCl, 1% NP40, 1% Natriumdeoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1
- Elutionspuffer (ChIP): 1% SDS, 0,1 M $NaHCO_3$
- 5× KCM-Puffer (Transformation): 0,5 M KCl, 0,15 M $CaCl_2$, 0,25 M $MgCl_2$
- TSS-Lösung (Transformation): 10% Polyethylenglycol, 5% DMSO, 20 mM $MgCl_2$, add 4,5 ml mit sterilem LB-Medium

3.1.11 siRNA

- siRNA gegen die humane PARP-1-mRNA (Dharmacon/Thermo Fisher Scientific, Colorado, USA): *sense*: 5'-gauuucaucuggugugauauu-3', *antisense*: 5'-uaucacaccagaugaaaucuu-3'
- Kontroll-siRNA-A: sc-37007 (Santa Cruz Biotechnology)

3.1.12 Vektoren

- **phRL-null-Vektor** (Promega)
  Der phRL-null-Vektor ist ein Renilla-Luziferase-Reportervektor, der eine synthetische *renilla*-Gensequenz (hRluc) enthält und bei der Transfektion von Zellen als Kontrollvektor verwendet wird. Zu diesem Zweck wurden die Zellen jeweils mit dem Zielkonstrukt und dem phRL-null-Vektor kotransfiziert. Die Vektorkarte des phRluc ist im Anhang in der Abbildung B.1 dargestellt.
- **pGL3-*basic*-Vektor** (Promega)
  Der pGL3-*basic*-Luziferase-Reportervektor enthält eine Gensequenz, die für die Firefly-Luziferase kodiert. Da er keine eukaryontischen Promotorelemente enthält, können putative regulative Elemente *upstream* des Luziferasegens kloniert werden. Die Stärke des Luziferasesignals lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der untersuchten Promotorelemente zu. Die Abbildung B.2 im Anhang zeigt die Karte des pGL3-*basic*-Luziferase-Reportervektors.

- **pGEM-T-*easy*-Vektorsystem** (Promega)
  Der pGEM-T-*easy*-Vektor ist ein linearisierter Klonierungsvektor. Die 3'-terminalen Thymidinüberhänge ermöglichen eine T/A-Klonierung von *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten. Die multiple Klonierungsstelle wird von T7- und SP6-RNA-Polymerase-Promotoren flankiert. Das Plasmid ermöglicht eine Selektion anhand einer Ampicillinresistenz sowie ein Blau-Weiß-*screening* aufgrund einer α-Komplementierung des β-Galactosidase-Gens (lacZ). Der Vektor ist im Anhang in der Abbildung B.3 dargestellt.

- **pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA-Expressionsvektor** (Invitrogen)
  Der pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA-Expressionsvektor ermöglicht die direkte Insertion von *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten. Die Zellen können anschließend mit diesem Vektor transfiziert werden, um das Zielgen zu exprimieren. Die Abbildung B.4 im Anhang zeigt die Karte des pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA-Expressionsvektors.

- **HEG0/pSG5**
  Der eukaryontische Expressionsvektor des Östrogenrezeptorgens α wurde freundlicher Weise von Pierre Chambon (Institut für Genetik und Molekularbiologie, Straßburg, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Die Vektorkarte des Expressionsvektors ist in der Abbildung B.5 im Anhang dargestellt.

- **TOPO-TA-*cloning*-Vektor** (Invitrogen)
  Der TOPO-TA-*cloning*-Vektor ermöglicht aufgrund seiner 3'-terminalen Thymidinüberhänge die direkte Insertion eines *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierten DNA-Produkts in den Vektor (Vektorkarte siehe Abbildung B.6).

3.1.13 Zellen und Zellkulturmedien

- **EA.hy926-Zellen**
  EA.hy926-Zellen sind humane Endothelzellen, die in 4,5 g/l D-glukosehaltigem Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren sowie 2% HAT-Zusatz kultiviert wurden. Die Zellen wurden freundlicher Weise von C.-J. Edgell (Chapel Hill, NC, USA) zur Verfügung gestellt.

- **KELLY-Zellen**
  Bei KELLY-Zellen handelt es sich um humane Neuroblastomazellen, die freundlicher Weise vom Institut für Physiologie (Charité, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 μg/ml Streptomycin angereichert war.

- **MCF-7-Zellen**
  Humane epitheliale MCF-7-Zellen wurden von Prof. G. Schönfelder (Institut für Toxikologie, Charité, Berlin, Deutschland) für die Untersuchungen bereitgestellt. Die Zellen wurden in 4,5 g/l D-glukosehaltigem Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μg/ml Streptomycin kultiviert.

- **Maus-Embryonale-Fibroblastenzellen (MEFs) von homozygoten PARP-1-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen**
  Die Zellen wurden von Z.-Q. Wang (Leibniz Institut für Altersforschung, Jena, Deutschland) zur Vefügung gestellt. Sie wurden in 4,5 g/l D-glukosehaltigem Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat sowie 0,02% β-Mercaptoethanol angereichert war.

Die Materialien, die in der Zellkultur verwendet wurden, sind im Anhang in der Tabelle A.2 aufgelistet. Die Zelllinien wurden in einem CO_2-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5% CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

3.1.14 Humane Gewebeproben

Die aufgearbeitete RNA der humanen Herzgewebeproben von gesunden Spendern wurde freundlicher Weise von Dr. J. Isensee (Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Spender zeigten keine Anzeichen einer Herzerkrankung, hatten ein unauffälliges EKG und Laborwerte ohne besondere Befunde. Es wurden außerdem keine morphologischen oder histologischen Abnormalitäten gefunden. Die Untersuchung erfolgte nach den ethischen Prinzipien der Erklärung von Helsinki.

Die Herzbiospien von pathologisch auffälligen Patienten wurden freundlicher Weise von Prof. C. Tschöpe (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Biopsien stammten aus dem linken Ventrikel von Patienten mit einer Herzinsuffizienz.

3.1.15 Murine Gewebeproben

Die Herzen gesunder Wistar-Ratten wurden freundlicher Weise von Dr. C. Thöne-Reineke (Institut für Pharmakologie, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die RNA aus den Herzen von Ratten, denen ein Herzinfarkt induziert wurde, wurde freundlicher Weise von Melanie Timm zur weiteren Analyse bereitgestellt. Der entsprechende Tierversuch wurde von Dr. E. Kaschina (Institut für Pharmakologie, Berlin, Deutschland) durchgeführt und ist in der Publikation Kaschina et al. (2008) ausführlich beschrieben.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen

Für die Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurde LB-Medium mit XL1-*blue* chemisch-kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Probe im Verhältnis von 1:200 in frisches LB-Medium überführt und bei 37 °C sowie 200 rpm kultiviert, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte von 0,5 bis 0,6 bei 600 nm aufwies. Anschließend wurde die Bakterienkultur für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 10 min bei 4000 rpm sowie 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml TSS-Lösung resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2 Klonierung

In dieser Arbeit wurden unterschiedlich große Reporterkonstrukte des humanen AT2R-, ATIP1- und TFF1-Promotors kloniert. Die einzelnen Klonierungsstrategien sind im Kapitel 3.2.3.4 ausführlich erläutert. In den nachfolgenden Abschnitten sind die allgemeinen Arbeitsschritte der Klonierung dargestellt.

Polymerasekettenreaktion

Für die Klonierung der Reporterkonstrukte wurde genomische DNA humaner Probanden als *template* für die PCR verwendet. Die PCR-Methode selbst wird im Kapitel 3.2.2.5 erläutert. Die verwendeten Primer sind im Anhang in den Tabellen A.3 und A.4 dargestellt. Sie besitzen Nukleotidsequenzen für Schnittstellen der Restriktionsenzyme Kpn*I* sowie Hind*III*. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese validiert. Bei korrekter Fragmentgröße wurden die Amplifikate mit Hilfe des *NucleoSpin-Plasmid-QuickPure-Kits* aufgereinigt.

Restriktion

500 ng des aufgereinigten PCR-Produkts wurden mit 1× Restriktionspuffer (Puffer C von Promega), 1 U Hind*III* und 1 U Kpn*I* in einem Gesamtvolumen von 10 μl über Nacht bei 37 °C verdaut. In einem parallelen Ansatz wurden 100 ng des Vektors pGL3-*basic* mit 1× Restriktionspuffer (Puffer C von Promega), 1 U Hind*III* und 1 U Kpn*I* in einem Gesamtvolumen von 10 μl über Nacht bei 37 °C geschnitten. Die Produkte wurden anschließend erneut mit dem *NucleoSpin-Plasmid-QuickPure-Kits* aufgereinigt.

Ligation

500 ng der *insert*-DNA wurden mit 100 ng Vektor-DNA, 1 U T4-DNA-Ligase und 1× Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 10 μl über Nacht bei 4 °C ligiert. Anschließend wurde die Ligase für 15 min bei 70 °C inaktiviert.

Nachdau

Nach der Ligation erfolgte eine weitere Restriktion mit dem Enzym Xho*1*. Je 8 μl des Ligationsansatzes wurden mit 1× Restriktionspuffer (Puffer C von Promega) und 1 U Xho*1* über Nacht bei 37 °C gedaut. Dieses Enzym schneidet in der multiplen Klonierungsstelle des ursprünglichen pGL3-*basic*-Vektors, nicht aber innnerhalb der Fragmente.

Transformation

50 ng DNA wurden mit 20 μl 5× KCM-Puffer, 78 μl H_2O und 100 μl XL1-*blue* chemisch-kompetenten *E.coli*-Bakterien für 20 Minuten auf Eis und anschließend für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurde 1 ml LB-Medium gegeben und die Suspension wurde anschließend für eine Stunde bei 37 °C sowie 180 rpm kultiviert. Von dem Transformationsansatz wurden 50-200 μl auf einer LB-Platte ausplattiert, die 100 μg/ml Ampicillin enthielt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Plasmidisolation

LB-Medium wurde mit 100 μg/ml Ampicillin versetzt und über Nacht mit einer Plattenkolonie bei 37 °C sowie 180 rpm kultiviert. Die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *Plasmid-DNA-Purification-NucleoBond-Xtra-Mini-Kits* beziehungsweise des entsprechenden *Midikits* durchgeführt und erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers. Alle Plasmide wurden mit Wasser eluiert. Die generierten Plasmide wurden abschließend mit Hilfe der DNA-Sequenzierung validiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin-RNA-II-Kits* nach Angaben des Herstellers. Die Gesamt-RNA aus humanen und murinen Geweben wurde dagegen mit Trizol isoliert. Das Gewebe wurde dafür zu Beginn in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend mit einem Mörser zerkleinert. Je 100 mg des Gewebes wurden in 1 ml Trizol aufgenommen und mit dem Ultraturrax (Schuett-Biotec, Göttingen,

Deutschland) homogenisiert. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte ebenfalls entsprechend der Angaben des Herstellers. Die RNA wurde am Ende der Aufarbeitung jeweils in H_2O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Die RNA-Qualität der Gewebeproben wurde mit Hilfe des Bioanalyzers (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) ermittelt.

3.2.2.3 DNase-Verdau

Während der Isolierung der RNA mit Hilfe des RNA-Isolationskits *NucleoSpin-RNA-II* fand der Verdau doppelsträngiger DNA bereits während der Aufarbeitung auf der Säule statt. Nach der Aufarbeitung der RNA mit dem Reagenz Trizol wurde anschließend ein zusätzlicher DNase-Verdau mit der RQ1-RNase-Free-DNase (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.4 Reverse Transkription von RNA

Die reverse Transkription der RNA wurde mit dem Enzym M-MLV-Reverse-Transkriptase und unter der Verwendung von Random-Hexamer-Primern (Promega) durchgeführt. Die cDNA-Synthese aus der RNA von humanen und murinen Gewebeproben erfolgte mit dem SuperScriptIII-System (Invitrogen). Für die Erststrangsynthese der cDNA wurde dabei ein Oligo(dT)15-Primer (Promega) verwendet. Die Arbeitsschritte fanden jeweils nach Herstellerangaben statt.

3.2.2.5 Polymerasekettenreaktion

Qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde jeweils in einem Gesamtvolumen von 25 μl mit 1× NH_4-PCR-Puffer, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTPs (je 2,5 mM pro dNTP), 10 μM je Primer, 2,5 U *Taq*-Polymerase, 20-100 ng genomischer DNA beziehungsweise 50-100 ng cDNA, add 25 μl H_2O angesetzt. Für die PCR wurde sowohl das PCR-System der Firma Invitek als auch das *HotStarTaq*-System von Qiagen verwendet. Die Tabellen 3.1 und 3.2 zeigen das jeweilige Temperaturprogramm für beide PCR-Systeme:

Tabelle 3.1: Temperaturprogramm für die Standard-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 Minuten
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Annealing	55 °C bis 65 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	30 Sekunden
40 Zyklen		
Abschließende Elongation	72 °C	10 Minuten

Tabelle 3.2: Temperaturprogramm für die *HotStarTaq*-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	15 Minuten
Denaturierung	94 °C	1 Minute
Annealing	64 °C bis 72 °C	1 Minute
Elongation	72 °C	30 Sekunden
40 Zyklen		
Denaturierung	94 °C	1 Minute
Annealing	64 °C bis 72 °C	1 Minute
Abschließende Elongation	72 °C	10 Minuten

Quantitative Polymerasekettenreaktion (*real-time*-PCR)

Die *real-time*-PCR wurde mit dem Mx3000P-Gerät (Stratagene, La Jolla, USA) und der Verwendung des *ABI-Power*-Mixes (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Zu einem Gesamtreaktionsansatz von 25 μl wurden 10 ng cDNA und 10 μM je Primer zugegeben. Für die *real-time*-PCR wurde das folgende Programm verwendet:

Tabelle 3.3: Temperaturprogramm für die *real-time*-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 Minuten
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
Annealing	60 °C	1 Minute
40 Zyklen		
Schmelzkurve	65-99 °C	

Die Produktspezifität wurde durch die Analyse der Schmelzkurve überprüft. Zusätzlich wurde bei jeder *real-time*-PCR eine sogenannte nicht-*template*-Kontrolle (NTC) mitgeführt, bei der das *template* durch Wasser ersetzt wurde. Die Auswertung erfolgte nach Normalisierung auf das entsprechende *housekeeping*-Gen nach der ΔC_T-Methode und wurde mit der entsprechenden Kontrolle verglichen ($\Delta\Delta C_T$-Methode). Der C_T-Wert (*cycle threshold*) gibt die Nummer des Zyklusses an, bei dem ein Fluoreszenzsignal über dem Schwellenwert detektiert wird. Ein ΔC_T-Wert entspricht einem PCR-Zyklus. Die Ratio gibt den relativen Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle an, der auf ein *housekeeping*-Gen normalisiert und auf eine Standardprobe bezogen wurde.

$$\Delta C_T = C_{T(Zielgen)} - C_{T(housekeeping-Gen)} \tag{3.1}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(Probe)} - \Delta C_{T(Kontrolle)} \tag{3.2}$$

$$Ratio = 2^{(-\Delta\Delta C_T)} \tag{3.3}$$

3.2.2.6 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Produkte der PCR wurden ensprechend ihrer Größe in einem Agarosegel zusammen mit einem entsprechenden Größenstandard (100 bp beziehungsweise 1 kb DNA *ladder*) mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Analyse der DNA-Fragmente wurden 1-2%ige Agarosegele und als Laufpuffer 1× TAE-Puffer verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für 20 Minuten durchgeführt. Abschließend wurden die Gele fotografiert (Chemidoc, Biorad) und dokumentiert.

3.2.2.7 RLM-5'-RACE

Für die Identfizierung der transkriptionellen Startpunkte des humanen AT2R- und ATIP1-Gens wurde die RNA-Ligase-vermittelte (RLM)-5'-RACE mit Hilfe des *GeneRacer-Kits* durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Ligation eines RNA-Oligonukleotidlinkers an die 5'-Enden von vollständigen mRNA-Transkripten vor der cDNA-Synthese. Anschließend erfolgte eine PCR mit einem genspezifischen und einem linkerspezifischen Primer, in der die 5'-Enden des entsprechenden Zielgens amplifiziert wurden. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten entsprechend der Herstellerangaben und werden nachfolgend kurz erläutert.

Für die Untersuchung des humanen AT2R-Gens wurde RNA des linken Herzventrikels eines gesunden Spenders verwendet. Die RNA wurde freundlicher Weise von H. Witt (Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung der transkriptionellen Startpunkte des ATIP1-Gens wurde mit RNA aus der humanen Neuroblastomazelllinie SHSY-5Y durchgeführt. Als Ausgangskonzentration dienten jeweils 4 μg RNA.

Zu Beginn des Versuches wurden die 5'-Phosphate der RNA mit dem Enzym *calf-intestinal-phosphatase* (CIP) dephosphoryliert. Intakte mRNA, die aufgrund ihrer *cap*-Struktur am 5'-Terminus geschützt ist, bleibt davon ausgeschlossen. Anschließend wurde die mRNA mit dem Enzym *tobacco-acid-pyrophosphatase* (TAP) behandelt und so die 5'-*cap*-Struktur der intakten und vollständigen mRNA entfernt. Dieser Prozess resultierte in einem freien 5'-Phosphatende, das für die folgende Ligation des GeneRacer-RNA-Oligos mit Hilfe der T4-RNA-Ligase notwendig ist. Dieses Oligo lieferte eine bekannte Sequenz für die GeneRacer-PCR-Primer. Die RT-PCR erfolgte mittels SuperScript-III-RT-Primern, die im *kit* mitgeliefert wurden. Die Sequenzen der verwendeten genspezifischen PCR- und *nested*-PCR-Primer sind im Anhang in der Tabelle A.5 dargestellt. Die PCR erfolgte mit dem *HotStarTaq*-System bei einer *annealing*-Temperatur von 64 °C. Die *annealing*-Temperatur der *nested*-PCR betrug sowohl für das AT2R-Gen als auch für das ATIP1-Gen 60 °C. Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde anschließend überprüft, ob während der PCR ein oder mehrere Amplifikate entstanden sind. Die PCR-Produkte wurden in den TOPO-TA-*cloning*-Vektor subkloniert und abschließend sequenziert. Durch eine genomische BLAST-Homologiesuche (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) der einzelnen Sequenzen wurden die transkriptionellen Startpunkte der beiden Gene ermittelt. Aufgrund dieses Verfahrens enspricht die erste Base der ermittelten Gensequenz dem transkriptionellen Startpunkt.

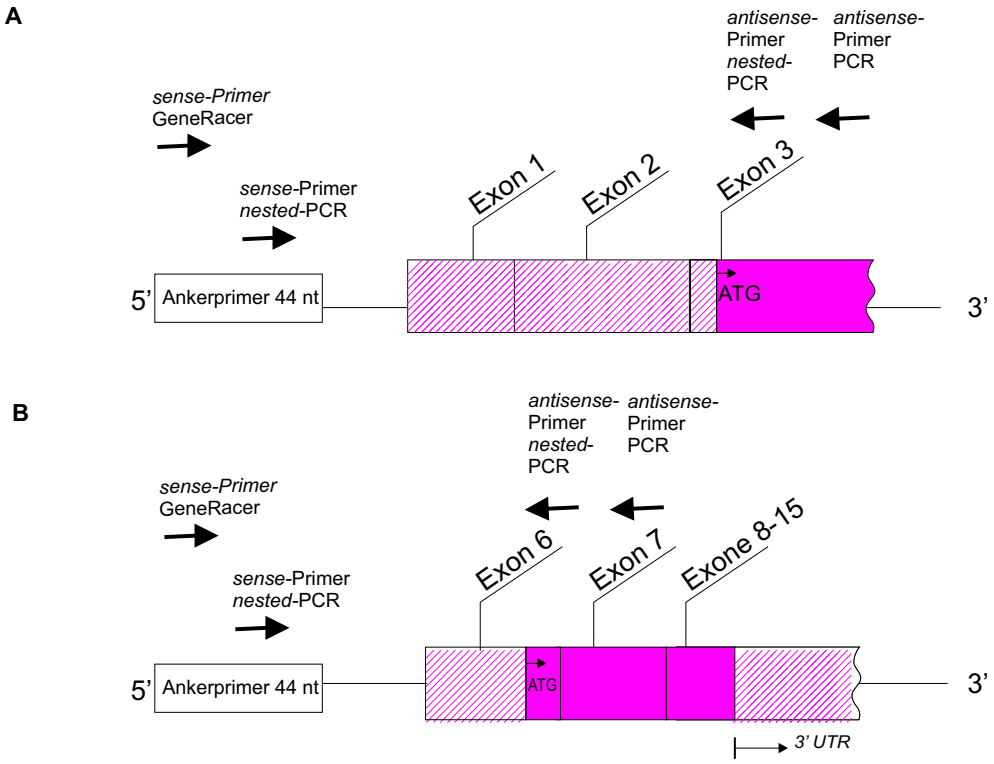


Abbildung 3.1: Lokalisation der Primer in der RLM-5'-RACE. Der jeweils kodierende Sequenzbereich der beiden Gene ist mit der Farbe rosa gekennzeichnet und die untranslatierten Bereiche (5'-UTR beziehungsweise 3'-UTR) sind schraffiert. (A) 5'-Struktur des humanen AT2R-Gens. Die genspezifischen *antisense*-Primer der PCR und der *nested*-PCR sind komplementär zu Sequenzen im Exon drei, *downstream* des Translationsstartpunkts. (B) 5'-Struktur des ATIP1-Gens mit den Exonen sechs, sieben und acht bis fünfzehn. Der genspezifische *antisense*-Primer der ersten PCR-Runde bindet an eine Sequenz im Exon sieben. Der *antisense*-Primer der *nested*-PCR ist komplementär zu einer Sequenz im isoformspezifischen Exon sechs, *downstream* des Translationsstartpunkts.

Die Abbildung 3.1 zeigt die 5'-Struktur des humanen AT2R- und ATIP1-Gens sowie die Lokalisation der verwendeten Primer während der RLM-5'-RACE. Die genspezifischen *antisense*-Primer des humanen AT2R-Gens der PCR und *nested*-PCR sind komplementär zu Sequenzen im Exon 3, *downstream* des Translationsstartpunkts. Der ATIP1 *antisense*-Primer der ersten PCR-Runde bindet an eine Sequenz im Exon sieben. Der ATIP1 *antisense*-Primer der *nested*-PCR ist komplementär zu einer Sequenz im Exon sechs, das isoformspezifisch für das ATIP1-Gen ist.

3.2.2.8 Luziferase-RLM-5'-RACE

Für die Identifizierung weiterer transkriptioneller Startpunkte des humanen AT2R-Gens wurde eine modifizierte Variante der RLM-5'-RACE durchgeführt, die sogenannte Luziferase-RLM-5'-RACE. Humane endotheliale EA.hy926-Zellen wurden mit den beiden AT2R-Promotorkonstrukten [-216 bp] und [-1316 bp] für 48 Stunden transient transfiziert (siehe Kapitel 3.2.3.4). Die RNA der transfizierten Zellen wurde isoliert und diente als Ausgangsmaterial für die RLM-5'-RACE, die wie in Kapitel 3.2.2.7 bereits beschrieben, erfolgte. Die Lokalisation der *antisense*-Primer der PCR sowie der *nested*-PCR sind in der Abbildung 3.2 dargestellt. Die Primersequenzen sind im Anhang in der Tabelle A.5 aufgelistet. Sowohl die PCR als auch die *nested*-PCR wurden mit dem *HotStarTaq*-System bei einer *annealing*-Temperatur von 64 °C durchgeführt. Die Reaktionsprodukte der PCR wurden mit Hilfe des TOPO-TA-*cloning*-Vektors subkloniert, sequenziert und mittels BLAST-Analyse ausgewertet.

Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem das phRL-null-Plasmid mit dem [-1316 bp]- beziehungsweise mit dem [-216 bp]-Konstrukt kotransfiziert und die Aktivität der beiden Promotorkonstukte über ein luziferasebasiertes Reportersystem überprüft wurde (siehe Kapitel 3.2.3.4).

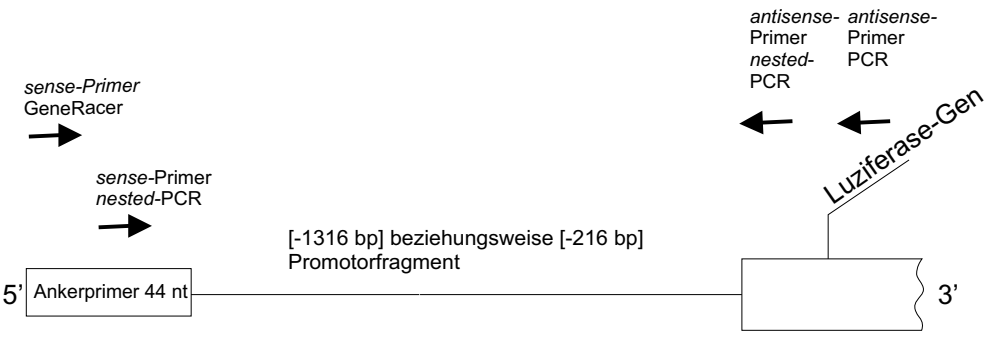


Abbildung 3.2: Lokalisation der Primer in der Luziferase-RLM-5'-RACE. 5'-Struktur des Luziferasegens des pGL3-*basic*-Vektors mit den beiden AT2R-Promotorkonstrukten [-1316 bp] beziehungsweise [-216 bp]. Die beiden genspezifischen *antisense*-Primer sind komplementär zu Sequenzen im Luziferasegen.

3.2.2.9 Chromatin-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurde die Bindung von Proteinen an die Promotor-DNA der beiden Zielgene ermittelt. Im Einzelnen wurde der Einfluss des weiblichen Hormons 17β-Östradiol (E2) auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor des TFF1-Gens sowie der Einfluss von PARP-1 auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II sowie des TATA-*binding*-Proteins (TBP) an die Promotoren des AT2R- und ATIP1-Gens ermittelt. Für die Analyse der PARP-vermittelten Effekte auf die beiden Zielgene wurde zu Beginn des Versuches die enzymatische Aktivität von PARP mittels 3-Aminobenzamid (3-AB) inhibiert. Die Durchführung des ChIP-Experiments erfolgte entsprechend der Protokollangaben von Bryant and Ptashne (2003). Die verwendeten Primer der PCR sind im Anhang in der Tabelle A.6 aufgelistet. Im Folgenden ist die jeweilige Versuchsdurchführung der einzelnen Experimente kurz erläutert.

Einfluss von E2 auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den TFF1-Promotor

$2 \cdot 10^7$ humane epitheliale MCF-7-Zellen wurden für 72 Stunden in steroid- und phenolrotfreiem Medium kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit 10 nM E2 beziehungsweise Vehikel stimuliert. Bei einer Zellkonfluenz von 90% wurden DNA-gebundene Proteine mit einer 1%igen Formaldehydlösung für 7 Minuten bei 37 °C an die DNA kovalent fixiert. Nach dem Entfernen dieser Lösung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst, in PBS-Puffer aufgenommen und in ein Falkonröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C sowie 2500 rpm in einer Eppendorfzentrifuge 5810/5810R wurde das Zellpellet in 2,5 ml ChIP-Lysepuffer resuspendiert und anschließend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit einem Ultraschallhomogenisator (Sonoplus HD 2070/UW 2070, Bandelin Electronics, Berlin, Deutschland) für 20 Sekunden bei 100% behandelt, wodurch ca. 500 bp große DNA-Fragmente generiert wurden. Die sonifizierte Suspension wurde für 5 Minuten bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Je 300 μl dieser Suspension wurden mit 3 μg polyklonalem Ziege *anti*-Pol II-Antikörper inkubiert. 22,5 μl des sonifizierten Lysats dienten als sogenanntes *input* und wurden nicht immunopräzipitiert. Es handelte sich dabei um DNA, die als Kontrolle fungierte. Die weiteren Versuchsschritte erfolgten entsprechend der Angaben von Bryant and Ptashne (2003). Die immunopräzipitierte DNA wurde mit der anschließenden *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen β-Aktin quantifiziert. Sowohl die *input*-DNA als auch ein weiterer PCR-Ansatz mit genomischer DNA dienten dabei als Positivkontrollen. Als Negativkontrolle wurde die Immunopräzipitation gegen das Protein MMP-2 durchgeführt, da dieses Protein nicht an den Promotorbereich des TFF1-Gens bindet. Die relative Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den TFF1-Promotor wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR nach den Gleichungen 3.4 sowie 3.5 berechnet.

Einfluss von PARP-1 auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II und TBP an die Promotoren des AT2R- und ATIP1-Gens

Für die Analyse bezüglich des AT2R-Gens wurden $2 \cdot 10^7$ humane neuronale KELLY-Zellen für 8 Stunden mit 30 mM 3-AB beziehungsweise mit dem Vehikel inkubiert. Die entsprechende Untersuchung des ATIP1-Gens wurde in endothelialen EA.hy926-Zellen durchgeführt, die für 24 Stunden mit 10 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel stimuliert wurden. Anschließend wurden in beiden Fällen die DNA-gebundenen Proteine mit einer 1% Formaldehydlösung für 7 Minuten bei 37 °C an die DNA fixiert. Die weiteren Versuchsschritte fanden nach den Angaben von Bryant and Ptashne (2003) statt. Die Immunopräzipitation wurde mit den folgenden Antikörpern durchgeführt: polyklonaler Kaninchen *anti*-TFIID (TBP) und monoklonaler Maus *anti*-PARP-1 für beide Gene, polyklonaler Kaninchen *anti*-TIMP-1 für die AT2R-Untersuchung sowie polyklonaler Ziege *anti*-Pol II und polyklonaler Kaninchen *anti*-TIMP-3 für die ATIP1-Analyse. Bei der Immunopräzipitation gegen TIMP-1 und TIMP-3 handelte es sich um Kontrollen, da die beiden Proteine nicht an die DNA-Bereiche der beiden Zielgene binden. Bei einem weiteren Kontrollansatz wurde nur Sepharose zu der sonifizierten DNA gegeben. Die relative Rekrutierung der Proteine an die Promotoren des AT2R- beziehungsweise ATIP1-Gens wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR ermittelt und nach den Gleichung 3.4 sowie 3.5 berechnet.

Berechnung der relativen Rekrutierung von Proteinen an die Promotor-DNA

Die Berechnung der relativen Rekrutierung der Proteine an den jeweils untersuchten DNA-Bereich erfolgte über die Gleichungen 3.4 sowie 3.5. Die Rekrutierung der Zielproteine wird gegen die Rekrutierung einer Komponente des Transkriptionsapparates wie beispielsweise der RNA-Polymerase II oder des TATA-*binding*-Proteins an den transkriptionellen Startpunkt des humanen β-Aktin-Promotors standardisiert.

$$X = \frac{2^{-\,[C_T\ [IP(Zielfragment),\ PCR(Zielgen)] -\ C_T\ [input,\ PCR(Zielgen)]]}}{2^{-\,[C_T\ (RNA{-}PolII),\ PCR(\beta{-}Aktin)] -\ C_T\ [input,\ PCR(\beta{-}Aktin)]]}} \tag{3.4}$$

In dieser Gleichung ist C_T [IP(Zielfragment), PCR(Zielgen)] der C_T-Wert des immunopräzipitierten Zielfragments, C_T [input, PCR(Zielgen)] und C_T [input, PCR(β-Aktin)] der C_T-Wert der *input*-Kontrollen des jeweiligen Zielgens sowie des β-Aktin-Gens und C_T (RNA-Pol II, PCR(β-Aktin) der C_T-Wert der immunopräzipitierten RNA-Polymerase II am β-Aktin-Promotor. Der Quotient X wird separat für die Inkubation mit einem Liganden [X(L)], beispielsweise E2 oder 3-AB und der entsprechenden Vehikelkontrolle [X(K)] berechnet. Aus dem Verhältnis dieser beiden Werte ergibt sich die relative Rekrutierung Y eines Proteins an den untersuchten DNA-Bereich:

$$Y = \frac{X(L)}{X(K)} \tag{3.5}$$

Für die Validität der Berechnungen müssen folgende Kriterien erfüllt sein, wobei ">" für einen Unterschied von mindestens drei C_T-Werten steht:

1. C_T[IP(Kontrollprotein), PCR(Zielgen)] > C_T[IP(Zielprotein), PCR(Zielgen)]
2. C_T[IP(Kontrollprotein), PCR(β-Aktin)] > C_T[IP(RNA-Polymerase II), PCR(β-Aktin)]
3. C_T[IP(Zielprotein), PCR(intergenisch)] - C_T[input, PCR(intergenisch)] > C_T[IP(Zielprotein), PCR(Zielgen) - C_T[input, PCR(Zielgen)]
4. C_T[IP(RNA-Polymerase II, PCR(intergenisch)] - C_T[input, PCR(interegnisch)] > C_T[IP(RNA Polymerase II, PCR(β-Aktin)] - C_T[input, PCR(β-Aktin)]
5. nicht-*template*-Kontrolle (NTC) ergibt kein Amplifikat nach 40 Zyklen.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Subkultivierung und Zellernte

Die Zellen wurden jeweils mit vorgewärmten PBS-Puffer gewaschen und für 2 Minuten mit 2 ml 1× Trypsin/EDTA pro 75 cm^2 Fläche bei 37 °C inkubiert. Die trypsinierten Zellen wurden in Medium mit 10% FCS aufgenommen, in ein 15 ml Falkon Reaktionsgefäß überführt und 1 Minute bei Raumtemperatur und 1000 rpm einer Eppendorfzentrifuge 5810/5810R zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis von jeweils 1:6 in neues Kulturmedium überführt. Für die Zellernte wurden die Zellen wie zuvor beschrieben behandelt. Nach der Zentrifugation wurde das Medium entfernt und das Zellpellet sofort bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

3.2.3.2 Kryokonservierung und Rekonstitution

Die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS-Puffer gewaschen und 2 Minuten bei 37 °C mit 1× Trypsin/EDTA behandelt (siehe oben), in neues Medium aufgenommen und 1 Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FSC, das 10% (v/v) DMSO enthielt, aufgenommen und anschließend in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekonstitution wurden die Zellen einer Kryokultur bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml frisches Medium überführt und bei Raumtemperatur eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und vollständig in eine neue Kulturschale überführt.

3.2.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Transfektionsversuche wurde vor dem Aussäen der Zellen die Zellzahl ermittelt. Die Zellen wurden mit vorgewärmten PBS-Puffer gewaschen und trypsiniert (siehe oben). Nach

der Zentrifugation wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. 10 μl der Zellsuspension wurden mit 10 μl Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Kammer (Sigma) pipettiert. Die lebenden, ungefärbten Zellen wurden in den 4 Großquadraten (GQ) unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Gesamtzellzahl pro Milliliter wurde über die Gleichung 3.6 berechnet:

$$Zellzahl = 2 \cdot (Mittelwert \cdot VF \cdot Kammerkonstante\ (10^4)) \tag{3.6}$$

Der Mittelwert wurde aus den ausgezählten Zellen pro Großquadrat ermittelt. Der Faktor 2 entspricht der Verdünnung, die durch die Zugabe des Trypanblau entstanden ist, VF enspricht dem Verdünnungsfaktor der Zellkultur.

3.2.3.4 Transfektion

Klonierungsstrategien

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Klonierung der folgenden Konstrukte:

- Elf Promotorkonstrukte des humanen AT2R-Gens: [-148 bp], [-216 bp] (dieses Konstrukt ist identisch zu dem [-216-A bp]-Konstrukt), [-316 bp], [-516 bp], [-716 bp], [-916 bp], [-1116 bp], [-1316 bp], [-1100 bp], [-216 bp invers] (enthält jeweils das A-Allel) und [-216-G bp]
- Sechs Promotorkonstrukte des ATIP1-Gens: [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp]
- Ein Promotorkonstrukt des humanen TFF1-Gens: [-568 bp]
- PARP-1-Expressionsvektor: PARP-1-pcDNA3.1-V5-His-TOPO
- Klonierung der RLM-5'-RACE-Produkte des AT2R- und ATIP1-Gens

Im Folgenden werden die Klonierungsstrategien der Konstrukte im Detail erläutert. Die generierten Plasmidkonstrukte wurden jeweils durch das Restriktionsenzymmapping und DNA-Sequenzierung überprüft.

Klonierungsstrategie der humanen AT2R-Promotorkonstrukte

Es wurden elf Deletionsmutanten des humanen AT2R-Promotors generiert und in den Luziferase-Reportervektor pGL3-*basic* kloniert. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang in der Tabelle A.3 aufgelistet.

In der Abbildung 3.3 ist die 5'-Struktur des humanen AT2R-Gens sowie die Größe und Position der generierten AT2R-Konstrukte schematisch dargestellt. Das [-148 bp]-Konstrukt besteht nur aus dem Intron 1. Das [-216 bp]-Konstrukt enthält neben dem Intron

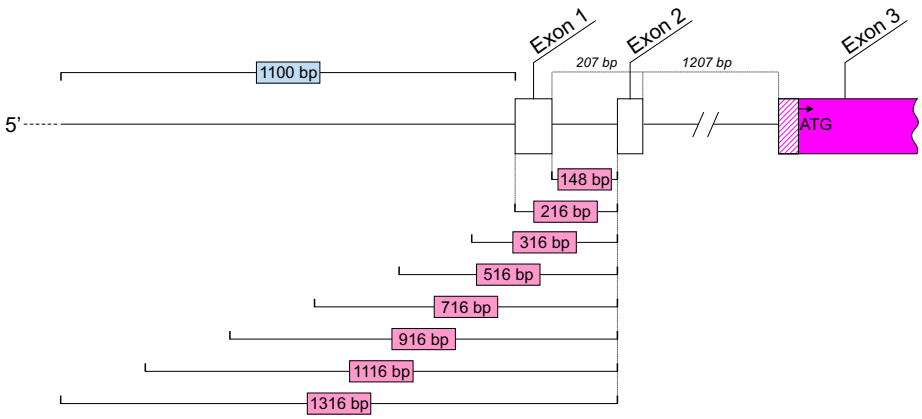


Abbildung 3.3: Promotor- und 5'-Struktur des humanen AT2R-Gens sowie die Darstellung der Größen und Positionen der generierten AT2R-Promotorkonstrukte. Das humane AT2R-Gen ist auf Chromosom X lokalisiert und besteht aus drei Exonen, wobei sich im Exon 3 der Translationsstartpunkt befindet. Für die Untersuchung des AT2R-Promotors wurden die folgenden acht Promotorkonstrukte generiert: [-148 bp], [-216 bp], [-316 bp], [-516 bp], [-716 bp], [-916 bp], [-1116 bp], [-1316 bp] und [-1100 bp]. Bis auf das [-1100 bp]-Konstrukt enthielten alle Deletionsmutanten den gleichen *antisense*-Primer, variieren jedoch in ihrer Größe im *upstream*-Bereich. Das [-1100 bp]-Konstrukt besitzt den gleichen *sense*-Primer wie das [-1316 bp]-Konstrukt, unterscheidet sich jedoch im *antisense*-Primer, der komplementär zu einer Sequenz vor Exon 1 ist.

1 zusätzlich das Exon 1. Die Größe der anderen sechs Konstrukte nimmt im *upstream*-Bereich vom [-316 bp] zum [-1316 bp]-Konstrukt um jeweils 200 bp zu. Das [-1100 bp]-Konstrukt besitzt den gleichen *sense*-Primer wie das [-1316 bp]-Konstrukt, unterscheidet sich jedoch im *antisense*-Primer, der komplementär zu der Sequenz vor dem Exon 1 ist.

Für die spezifische Untersuchung des Exon-1-/Intron-1-Bereichs wurde das [-216 bp]-Konstrukt zusätzlich in inverser Orientierung in den Luziferase-Reportervektor pGL3-*basic* kloniert. Die Abbildung 3.4 zeigt die 5'-Struktur des humanen AT2R-Gens sowie die beiden generierten [-216 bp]-Konstrukte in *sense*- und in inverser Orientierung. Der *sense*-Primer des [-216 bp]-Konstrukts der *sense*-Orientierung besitzt Sequenzen für das Restriktionsenzym Kpn*I*. Der *antisense*-Primer enthält Sequenzen für das Enzym Hind*III*. Für die Klonierung des inversen [-216 bp]-Konstrukts wurde ein *sense*-Primer verwendet, der Sequenzen für das Enzym Hind*III* enthält und ein *antisense*-Primer, der Sequenzen für das Enzym Kpn*I* aufweist.

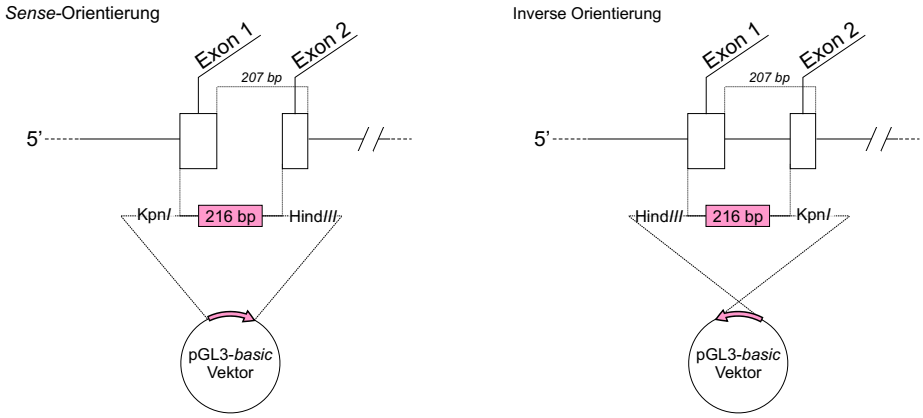


Abbildung 3.4: Promotor- und 5'-Struktur des humanen AT2R-Gens mit dem [-216 bp]-Konstrukt in *sense*- und inverser Orientierung.

In dieser Arbeit wurde zusätzlich der humane AT2R-Polymorphismus -G1332A mit der rs-Nummer 1403543 analysiert, der sich 1332 bp *uptream* vom Translationsstartpunkt im Intron 1 befindet. Dazu wurde ein 216 bp großes PCR-Produkt generiert, das sogenannte [-216-G bp]-Konstrukt, das 1332 bp *upstream* vom Startpunkt der Translation das Nukleotid Guanin enthält. Das Amplifikat wurde in den pGL3-*basic*-Luziferase-Reportervektor kloniert. Wenn in dieser Arbeit nicht explizit auf das [-216-G bp]-Konstrukt hingewiesen wird, beinhaltet das [-216 bp]-Promotorkonstrukt an dieser Position jeweils das A-Allel. In der Abbildung 3.5 ist die 5'-Struktur und die Position des [-216-A bp]- beziehungsweise [-216-G bp]-Konstrukt des humanen AT2R-Gens schematisch dargestellt.

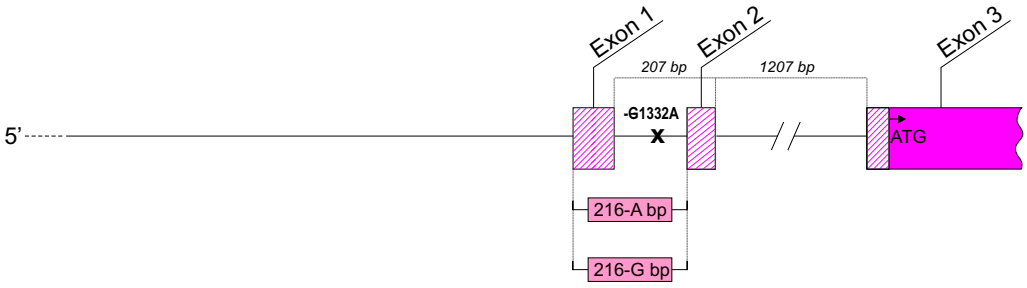


Abbildung 3.5: Position des AT2R-Polymorphismus -G1332A sowie Darstellung des [-216-A bp]- und [-216-G bp]-Promotorkonstrukts.

Klonierungsstrategie der ATIP1-Promotorkonstrukte

Die generierten ATIP1-Promotorkonstrukte wurden in den pGL3-*basic*-Luziferase-Reportervektor kloniert. In der Abbildung 3.6 ist die 5'-Struktur des ATIP1-Gens mit den entsprechenden Promotorkonstrukten schematisch dargestellt. Das Exon 6 ist isoformspezifisch und enthält den Translationsstartpunkt des ATIP1-Gens. Die Promotorkonstrukte besitzen jeweils den gleichen *antisense*-Primer, der komplementär zu einer Sequenz *upstream* vom Translationsstartpunkt im Exon 6 ist. Die Länge der Konstrukte im 5'-Bereich nimmt jeweils um 200 bp zu. Die Primersequenzen sind im Anhang in der Tabelle A.4 aufgelistet.

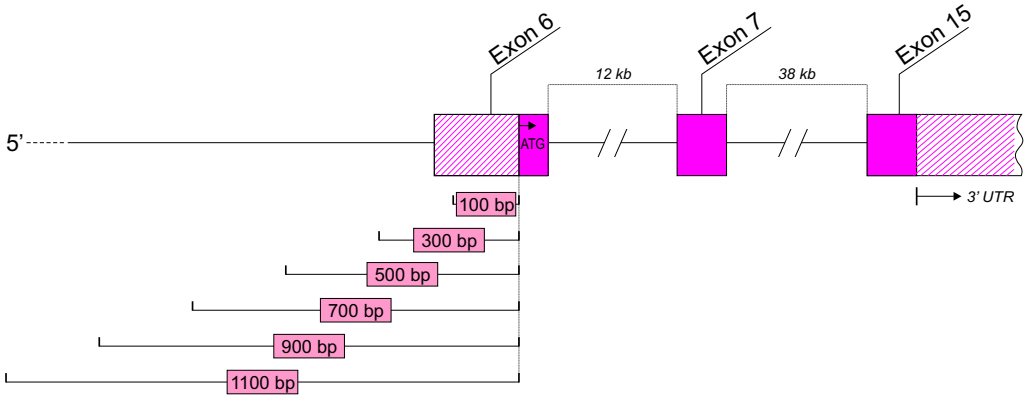


Abbildung 3.6: Promotor- und 5'-Struktur des ATIP1-Gens sowie der generierten ATIP1-Deletionsmutanten. Das ATIP1-Gen ist auf Chromosom 8 lokalisiert. Das Exon 6 ist isoformspezifisch für das ATIP1-Gen und enthält den Translationsstartpunkt. Die dargestellten sechs Deletionsmutanten besitzen den gleichen *antisense*-Primer, der komplementär zu einer Sequenz im Exon 6 ist. Die *sense*-Primer der Konstrukte sind im *upstream*-Bereich jeweils um 200 bp versetzt.

Klonierungsstrategie des humanen TFF1-Promotorkonstrukts

Zur Klonierung eines 568 bp großen TFF1-Promotorkonstrukts wurden die folgenden Primer verwendet: 5'-gaggagggtaccgattacaggcgtgagccactg-3' (*sense*), 5'- gaggaggaagcttgcctcct ctctgctccaaag-3' (*antisense*). Der *sense*-Primer enthält Nukleotidsequenzen für das Restriktionsenzym Kpn*I* und der *antisense*-Primer für das Enzym Hind*III*. Das Promotorkonstrukt des TFF1-Gens wurde in den Luziferase-Reportervektor pGL3-*basic* kloniert. Die Abbildung 3.7 zeigt die 5'-Struktur des TFF1-Gens sowie die Lokalisation des [-568 bp]-Konstrukts. Der Startpunkt der Translation des TFF1-Gens befindet sich im Exon 1. Zusätzlich wurde ein weiteres Promotorkonstrukt des TFF1-Gens verwendet, das eine Größe von 1300 bp besitzt und ebenfalls den Vektor pGL3-*basic* als *backbone* hat. Dieses Konstrukt wurde freundlicher Weise von Prof. G. Schönfelder (Institut für Toxikologie, Charité, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

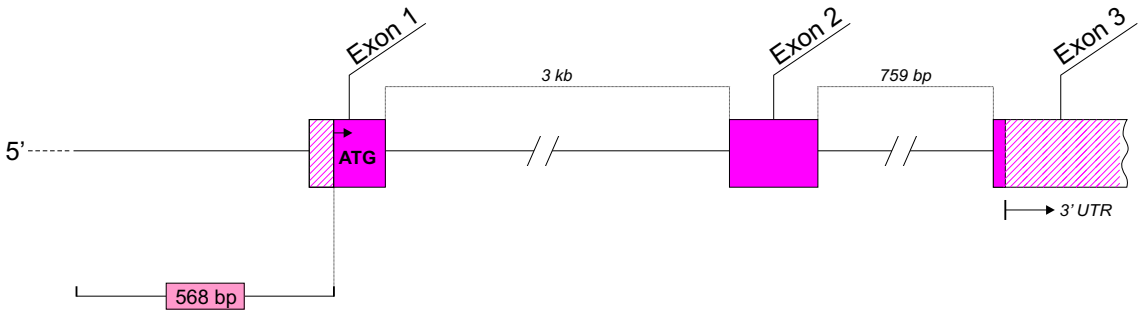


Abbildung 3.7: Promotor- und 5'-Struktur des humanen TFF1-Gens. Das TFF1-Gen ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert. Der Translationsstartpunkt befindet sich im Exon 1.

Klonierung des humanen PARP-1-Expressionsvektors

Der vollständige Leserahmen des humanen PARP-1-Gens wurde in den pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA-Expressionsvektor kloniert. Für die PCR wurden die folgenden Primer verwendet: 5'-gggaggatggcggagtcttcggata-3' (*sense*) und 5'-ttaccacaggggaggtcttaaaattg-3' (*antisense*).

Transfektionsbedingungen

Für die Transfektionsversuche in neuronalen KELLY-Zellen wurden die Zellkulturplatten vor dem Aussäen der Zellen für 1 Stunde mit 0.005 mg/ml Poly-*L*-Lysin (Biochrom) beschichtet. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz *GeneJuice* nach Angaben des Herstellers transient transfiziert. Die Messung der Promotoraktivität erfolgte mit Hilfe des *dual-luciferase-reporter-assay*-Systems. Für die Standardisierung wurden die Zellen jeweils mit dem phRL-null-Plasmid kotransfiziert. Die Promotoraktivität wurde als relative Luziferaseaktivität (RLA) nach der Gleichung 3.7 berechnet.

$$RLA = \frac{MW_{Konstrukt}(Firefly_{Luziferase}/Renilla_{Luziferase})}{MW_{pGL3-Basic-Leervektor}(Firefly_{Luziferase}/Renilla_{Luziferase})} \tag{3.7}$$

In dieser Gleichung ist MW der jeweilige Mittelwert aus vier separaten Transfektionsexperimenten.

Basale Transfektionsbedingungen

Die Untersuchung der Promotoraktivitäten unter basalen Transfektionsbedingungen betrifft die folgenden Promotorkonstrukte:

- Für das humane AT2R-Gen: [-148 bp], [-216 bp], [-216 bp invers], [-1316 bp], [-1100 bp], [-316 bp], [-516 bp], [-716 bp], [916 bp] und [-1116 bp]. Diese Konstrukte wurden in epithelialen MCF-7-Zellen analysiert.
  Die Analyse bezüglich des Polymorphismus wurde in neuronalen KELLY-Zellen durchgeführt, die mit dem [-216 bp]- und dem [-216-G]-Konstrukt transfiziert wurden. Bei dem [-216 bp]-Konstrukt handelt es sich jeweils um das [-216-A bp]-Konstrukt.
- Für das ATIP1-Gen: [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp]. Die Deletionsmutanten wurden in endothelialen EA.hy926-Zellen und epithelialen MCF-7-Zellen untersucht.

Der generelle Ablauf der Untersuchung ist in der Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf 4 Löcher einer 12-Lochplatte.

Tabelle 3.4: Basale Transfektionsbedingungen

Zeit	Bedingung
Tag 0	Aussäen von $5{\cdot}10^5$ Zellen pro Loch einer 12-Lochplatte
Tag 1	Mediumswechsel
	Transfektion mit 1 μg des jeweilig untersuchten Konstrukts
	Kotransfektion mit 0,5 μg phRL-null-Plasmid
Tag 2	Mediumswechsel
Tag 3	Zellernte mit 1× Lysepuffer (Promega)

Untersuchung des E2-Einflusses auf das Promotorverhalten der AT2R-, ATIP1- und TFF1-Gene

Zu Beginn der gesamten Östrogenversuche wurden die Zellen für 72 Stunden in steroid- und phenolrotfreiem Medium kultiviert. In der Tabelle 3.5 sind die entsprechenden Transfektionsbedingungen dargestellt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich jeweils auf 4 Löcher einer 12-Lochplatte.

Tabelle 3.5: Transfektionsbedingungen unter der Stimulation mit E2

Zeit	Bedingung
Tag 0	Aussäen von $5{\cdot}10^5$ Zellen pro Loch einer 12-Lochplatte in steroid- und phenolrotfreiem Medium, das 10 nM E2 beziehungsweise Vehikel (EtOH oder H_2O) enthielt
Tag 1	Mediumswechsel und erneute Zugabe von 10 nM E2 beziehungsweise Vehikel Transfektion mit 1 μg des jeweilig untersuchten Konstrukts Kotransfektion mit 0,5 μg phRL-null-Plasmid
Tag 2	Mediumswechsel und erneute Zugabe von 10 nM E2 beziehungsweise Vehikel
Tag 3	Zellernte mit 1× Lysepuffer

Untersuchung des E2-Einflusses auf den humanen TFF1-Promotor

Humane MCF-7-Zellen wurden mit unterschiedlichen Plasmidkombinationen kotransfiziert. Als Vehikelkontrolle wurde Ethanol beziehungsweise Wasser verwendet. Die Transfektions- und Stimulationsbedingungen sind in der Tabelle 3.5 erläutert. Im Folgenden sind die einzelnen Transfektionsansätze dargestellt:

1. [-568 bp]-TFF1-Promotorkonstrukt/pGL3-*basic*
2. [-568 bp]-TFF1-Promotorkonstrukt/pGL3-*basic* + ERα/pSG5-Expressionsvektor
3. [-568 bp]-TFF1-Promotorkonstrukt/pGL3-*basic* + pSG5-Leervektor
4. pGL3-*basic*-Leervektor + ERα/pSG5-Expressionsvektor
5. pGL3-*basic*-Leervektor + pSG5-Leervektor

Untersuchung des E2-Einflusses auf den humanen AT2R-Promotor

Epitheliale MCF-7-Zellen wurden für 24 Stunden mit den AT2R-Konstrukten [-1316 bp], [-1100 bp], [-148 bp], [-216 bp] und [-216 bp invers] transient transfiziert und unter Östrogenbedingungen analog Tabelle 3.5 untersucht.

Untersuchung des E2-Einflusses auf den ATIP1-Promotor

Endotheliale EA.hy916-Zellen wurden mit den ATIP1-Promotorkonstrukten [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp] für 24 Stunden transient transfiziert und gleichzeitig mit 10 nM E2 beziehungsweise der Vehikelkontrolle Ethanol stimuliert (Tabelle 3.5).

Untersuchung des PARP-1-Einflusses auf die Promotoren des humanen AT2R-Gens und des ATIP1-Gens

Transfektion unter PARP-Inhibition

$5{\cdot}10^5$ neuronale KELLY-Zellen wurden am Tag 0 pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden am Tag 1 mit den AT2R-Konstrukten [-1316 bp], [-1100 bp], [-148 bp] und [-216 bp] transient transfiziert. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumswechsel. Die Zellen wurden dabei gleichzeitig mit 30 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel stimuliert und nach 8 Stunden mit 1× Lysepuffer geerntet.

Der Einfluss von PARP-1 auf den ATIP1-Promotor wurde in endothelialen EA.hy926-Zellen untersucht. Am Tag 0 wurden $5{\cdot}10^5$ Zellen pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät und am folgenden Tag mit den [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp]-Konstrukten transient transfiziert. Die Zellen wurden am Tag 2 für weitere 24 Stunden mit 10 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel stimuliert und anschließend mit 1× Lysepuffer geerntet.

Kotransfektion des PARP-1-Expressionsvektors

Am Tag 0 wurden $5{\cdot}10^5$ neuronale KELLY-Zellen pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Am Tag 1 wurden die Zellen mit folgenden AT2R-Konstrukten [-1316 bp], [-1100 bp], [-148 bp] und [-216 bp] und dem PARP-1-Expressionsvektor für 24 Stunden kotransfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit 1× Lysepuffer geerntet.

$5{\cdot}10^5$ endotheliale EA.hy926-Zellen wurden pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mit den [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp]-ATIP1-Konstrukten und dem PARP-1-Expressionsvektor kotransfiziert und nach weiteren 24 Stunden mit 1× Lysepuffer geerntet.

Transfektion von embryonalen Mausfibroblastenzellen von PARP-1-*knockout*- beziehungsweise Wildtyp-Mäusen

Am Tag 0 wurde $5{\cdot}10^5$ embryonale Mausfibroblastenzellen (MEFs) von homozygoten PARP-1-*knockout*-Mäusen (KO) und Wildtyp-Mäusen (WT) pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Am Tag 1 wurden die Zellen mit den [-1316 bp], [-1100 bp], [-148 bp] und [-216 bp]-AT2R-Promotorkonstrukten sowie den ATIP1-Konstrukten [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp] unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Lipofektamin transient transfiziert und nach 24 Stunden mit 1× Lysepuffer geerntet.

Transfektion der EA.hy926-Zellen mit siRNA gegen die PARP-1-mRNA

Am Tag 0 wurden $2.5 \cdot 10^5$ endotheliale EA.hy926-Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 20 μM siRNA gegen die PARP-1-mRNA beziehungsweise 20 μM Kontroll-siRNA pro 4 Loch einer 24-Lochplatte mit dem Transfektionsreagenz *HiPerFect* transient transfiziert. Die Zellen wurden nach weiteren 24 Stunden geerntet. Dafür wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von der Plattenoberfläche gelöst. Die Zellen wurden in PBS-Puffer aufgenommen und 1 min bei 4 °C sowie 1000 rpm einer Eppendorfzentrifuge 5810/5810R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA aus den Zellen isoliert (Kapitel 3.2.2.1). Anschließend wurde die mRNA-Expression des ATIP1-Gens sowie des PARP-1-Gens mit Hilfe der *real-time*-PCR ermittelt.

3.2.3.5 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurde jeweils der Zweistichproben t-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p–Wert von $p < 0{,}05$ angenommen. In den Histogrammen kennzeichnen die vertikalen Linien jeweils die Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens

Zur Etablierung eines geeigneten Zellsystems für die folgenden Versuche wurde die endogene Expression des AT2R-Gens und des ATIP1- beziehungsweise ATBP50-Gens mit Hilfe der qualitativen Polymerasekettenreaktion in verschiedenen humanen und murinen Zellsystemen ermittelt. In den humanen Zelllinien wurde zusätzlich die endogene Expression des AT1R-Gens und in murinen Zellen diejenige des AT1aR- beziehungsweise AT1bR-Gens untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit sollte der Einfluss des weiblichen Sexualhormons 17β-Östradiol (E2) auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens bestimmt werden. Für diese Analysen wurden die Zellen zusätzlich auf die Expression des *trefoil-faktor-1*-Gens (TFF1) sowie der beiden Östrogenrezeptorgene α (ERα) und β (ERβ) überprüft. Die endogene Expression dieser Gene wurde außerdem in primären kardialen Fibroblastenzellen untersucht, die zuvor aus dem Gesamtherz von weiblichen und männlichen, zehn Tage alten gesunden Wistar-Ratten isoliert wurden. Die isolierte RNA aus diesen Zellen wurde freundlicher Weise von E. Dworatzek (Center for Cardiovascular Research, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit wurden die regulativen Effekte des Proteins Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) auf die Transkription des AT2R-Gens und ATIP1-/ATBP50-Gens ermittelt. Für diese Analysen wurden neuronale KELLY- und endotheliale EA.hy926-Zellen zusätzlich auf die endogene Expression des PARP-1-Gens untersucht.

Tabelle 4.1: Expressionsanalyse des AT2R-, ATIP1-, ERα-, ERβ-, TFF1- und PARP-1-Gens mit Hilfe der qualitativen PCR in humanen Hela-S3-, MCF-7-, EA.hy926-, SH-Sy5Y- und KELLY-Zellen ("+": Expression ist nachgewiesen, "–": keine Expression, "n.a.": nicht analysiert).

Zellart	Herkunft	AT2R	ATIP1	ERα	ERβ	AT1R	TFF1	PARP-1
Hela-S3	epithelial	–	–	–	–	–	+	n.a.
MCF-7	epithelial	–	–	+	+	–	+	n.a.
EA.hy926	endothelial	–	+	+	+	–	–	+
SH-Sy5Y	neuronal	–	+	–	+	–	–	n.a.
KELLY	neuronal	+	+	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	+

Zur Ermittlung der endogenen AT2R-Expression wurden putativ positive AT2R-Amplifikate der PCR in den pGEM-T-*easy*-Vektor subkloniert und anschließend sequenziert. Die Auswertung dieser Sequenzen erfolgte mit Hilfe der BLAST-Analyse gegen die humane AT2R-Sequenz (GenBank *accession*-Nr. NM_000686.4). Diese zeigte, dass das humane AT2R-Gen nur von neuronalen KELLY-Zellen endogen exprimiert wird (Tabelle 4.1). Bei den PCR-Amplifikaten der richtigen Fragmentgröße von 263 bp aus Hela-S3-, MCF-7- und EA.hy926-Zellen konnte dagegen nur eine partielle Übereinstimmung mit der AT2R-Sequenz ermittelt werden. Die BLAST-Analyse dieser Amplifikatsequenz gegen das humane Genom zeigte jedoch, dass dieses Insert mit Sequenzen der Chromosomen 5 und 7 vollständig homolog ist. Für das PCR-Amplifikat wurde mit Hilfe des Programms ClustalX ein paarweises Sequenzalignment gegen die humane AT2R-Sequenz durchgeführt (Abbildung 4.1).

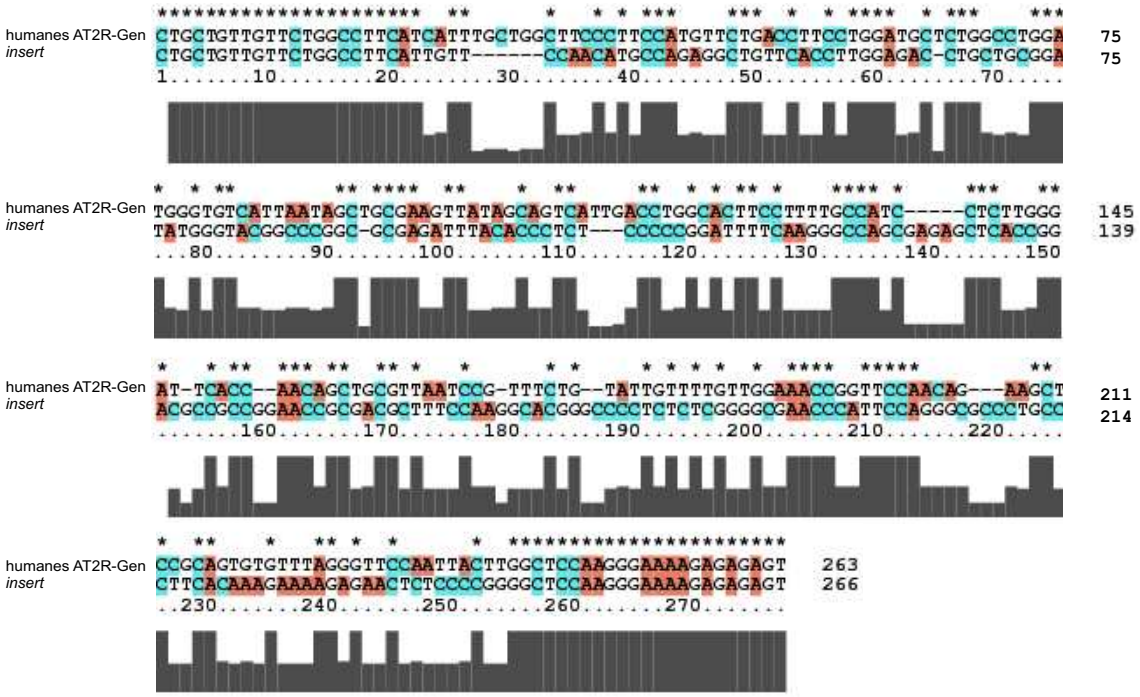


Abbildung 4.1: Paarweises Sequenzalignment der humanen AT2R-Sequenz (GenBank *accession*-Nr. NM_000686.4) und der Sequenz des AT2R-PCR-Amplifikats aus MCF-7-Zellen (sogenanntes "*insert*"). Das Zeichen '$*$' zeigt jeweils an, dass eine vollständige Homologie der Sequenzen vorliegt. Die Säulenhöhe ist repräsentativ für das Maß der Homologie. Je kleiner die Säulenhöhe, desto geringer ist die Homologie.

In den Bereichen des *sense*-Primers (1-22 bp) und des *antisense*-Primers (240-263 bp) zeigte das Alignment eine vollständige Homologie. Die eigentliche Insertsequenz wies dagegen nur eine 85%ige Homologie zu der genomischen DNA-Sequenz des AT2R-Gens auf.

Das ATIP1-Gen wird von endothelialen EA.hy926-Zellen sowie von den neuronalen Zelllinien SH-Sy5y und KELLY exprimiert. Das humane ERα-Gen wird von MCF-7- sowie EA.hy926-Zellen und das humane ERβ-Gen von MCF-7-, EA.hy926- sowie SH-Sy5y-Zellen transkribiert. Das PARP-1-Gen wird endogen von EA.hy926- und KELLY-Zellen exprimiert.

Tabelle 4.2: Expressionsanalyse des AT2R-, ATBP50-, ERα-, ERβ-, AT1aR- und AT1bR-Gens mit Hilfe der qualitativen PCR in murinen H9c2-, PC12W-, kardialen Fibroblasten- und Adipozytenzellen ("+": Expression nachgewiesen, "–": keine Expression).

Zellart	Herkunft	AT2R	ATBP50	ERα	ERβ	AT1aR	AT1bR
H9c2	Kardiomyoblasten	–	+	+	+	–	–
PC12W	Pheochromocytoma	+	+	+	+	–	–
Fibroblasten	kardial, weiblich	–	+	–	+	+	–
Fibroblasten	kardial, männlich	–	+	–	–	+	–

Die entsprechende Expressionsanalyse in murinen Zellen ist in der Tabelle 4.2 dargestellt. Diese zeigt, dass das AT2R-Gen nur von pheochromocytomalen PC12W-Zellen exprimiert wird. Alle untersuchten murinen Zellen exprimieren das ATBP50-Gen. Das ERα-Gen wird von kardialen Firboblastenzellen exprimiert, die aus den Herzen weiblicher Tiere isoliert wurden. Von den Fibroblastenzellen der männlichen Tiere wird dagegen weder das ERα- noch das ERβ-Gen transkribiert. Keine der analysierten murinen Zellen exprimiert das AT1bR-Gen. Dagegen wird das AT1aR-Gen von kardialen Fibroblastenzellen aus männlichen und weiblichen kardialen Fibroblastenzellen transkribiert.

Für die weiteren Untersuchungen wurde das humane Zellsystem ausgewählt. Die Untersuchung des E2-Einflusses auf die Transkription des AT2R- und ATIP1-Gens wurde in MCF-7- beziehungsweise EA.hy926-Zellen durchgeführt. Für die Analysen der PARP-1-Regulation wurden EA.hy926- und KELLY-Zellen verwendet.

4.2 Transkriptionsstartpunkte des humanen AT2R- und ATIP1-Gens

Die Transkriptionsstartpunkte des humanen AT2R- und ATIP1-Gens wurden mit Hilfe der RNA-Ligase-vermittelten (RLM)-5'-RACE und anschließender bioinformatischer Auswertung identifiziert (siehe Kapitel 3.2.2.7). Für die RLM-5'-RACE des AT2R-Gens wurde RNA aus gesundem humanem Gesamtherz verwendet. Die RLM-5'-RACE des ATIP1-Gens wurde mit RNA durchgeführt, die zuvor aus neuronalen SH-Sy5Y-Zellen isoliert wurde. Für die Identifizierung des Startpunktes der ATIP1-Isoform wurde für die *nested*-PCR ein *antisense*-Primer verwendet, der komplementär zu der Exon 6-Sequenz designt wurde.

Die Abbildung 4.2 zeigt das Ergebnis der RLM-5'-RACE für das humane AT2R-Gen. Die *nested*-PCR der RLM-5'-RACE resultiert in einem Amplifikat, das eine Größe von etwa 250 bp aufweist (A). Die Sequenzierung dieses PCR-Produkts und die anschließende Auswertung mittels BLAST-Analyse ergibt einen transkriptionellen Startpunkt, der 1533 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt sowie 29 bp *downstream* von der TATA-*box* lokalisiert ist (B). Das TATA-*box*-Element wurde mit Hilfe des online verfügbaren Programms MatInspector (http://www.genomatix.de) in der AT2R-Promotorsequenz identifiziert. Dieses Element befindet sich 1566 bp *upstream* vom Translationsstart.

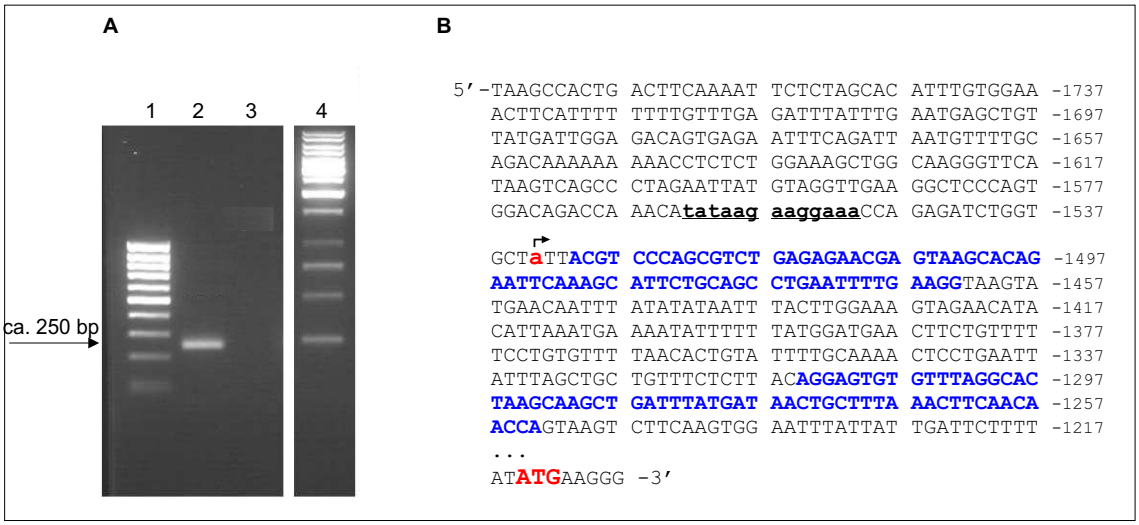


Abbildung 4.2: Darstellung des transkriptionellen Startpunktes des humanen AT2R-Gens, der mit Hilfe der RLM-5'-RACE im humanem Herzen identifiziert wurde. A: Agarosegel des resultierenden PCR-Produkts; 1: 100 bp DNA *ladder*, 2: RLM-5'-RACE-Produkt aus humanem Herzen, 3: Wasserkontrolle, 4: 1 kb DNA *ladder*. B: Proximale Promotorregion des humanem AT2R-Gens (GenBank *accession*-Nr. GI:51477555) mit dem neu identifizierten transkriptionellen Startpunkt 'a' (fett und rot sowie Pfeil), der TATA-*box* (fett und unterstrichen), den Exonen 1 und 2 (fett und blau) sowie dem Translationsstartpunkt 'ATG' (fett und rot).

In der Abbildung 4.3 ist das entsprechende Ergebnis der RLM-5'-RACE für das ATIP1-Gen dargestellt. Das Produkt der *nested*-PCR der RLM-5'-RACE besitzt eine Größe von etwa 100 bp (A). Für das ATIP1-Gen wurden zwei transkriptionelle Startpunkte identifiziert, die 293 bp und 304 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt liegen (B). Die MatInspector-Analyse hat ergeben, dass das ATIP1-Gen in seiner Promotorsequenz keine Konsensussequenz einer TATA-*box* enthält.

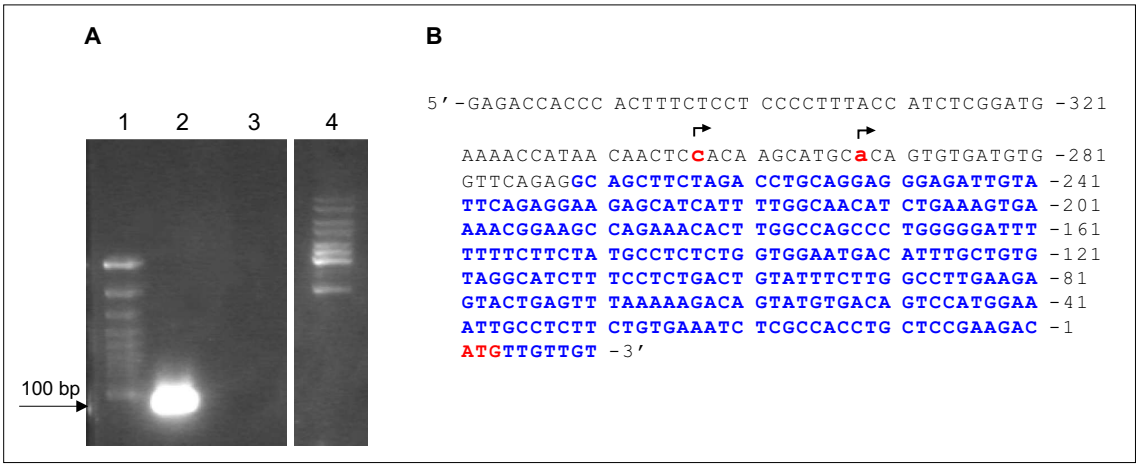


Abbildung 4.3: Darstellung der beiden transkriptionellen Startpunkte des ATIP1-Gens, die mit Hilfe der RLM-5'-RACE in humanen neuronalen SH-Sy5y-Zellen identifiziert wurden. A: Agarosegel des resultierenden PCR-Produkts; 1: 100 bp DNA *ladder*, 2: RLM-5'-RACE-Produkt aus humanen neuronalen SH-Sy5y-Zellen, 3: Wasserkontrolle, 4: 1 kb DNA *ladder*. B: Proximale Promotorregion des ATIP1-Gens (GenBank *accession*-Nr. GI:17224595) mit den beiden identifizierten transkriptionellen Startpunkten 'c' und 'a' (fett und rot sowie Pfeil), dem ersten ATIP1-spezifischen Exon (fett und blau) und dem Translationsstartpunkt 'ATG' (fett und rot).

4.3 Identifizierung regulativer Elemente im humanen AT2R- und ATIP1-Promotor

Zur Identifizierung regulativer Elemente innerhalb des humanen AT2R- und ATIP1-Promotors wurden unterschiedlich große Deletionsmutanten der Promotoren beider Gene generiert und in den Reportervektor pGL3-*basic* kloniert (siehe Abbildungen 3.3 und 3.6 in Kapitel 3.2.3.4). Humane MCF-7-Zellen wurden für 48 Stunden mit den folgenden AT2R-Konstrukten transient transfiziert: [-148 bp], [-216 bp], [-316 bp], [-516 bp], [-716 bp], [-916 bp], [-1116 bp], [-1316 bp] und [-1100 bp]. Für die Analyse des ATIP1-Promotors wurden sowohl MCF-7-Zellen als auch EA.hy926-Zellen mit den Promotorkonstrukten [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp] für 48 Stunden transient transfiziert. Die Promotoren beider Gene wurden innerhalb dieser Versuchsreihe unter basalen Bedingungen charakterisiert. Die Promotoraktivität wurde nach der Zellernte über ein luziferasebasiertes Reportersystem als relative Luziferaseaktivität (RLA) ermittelt.

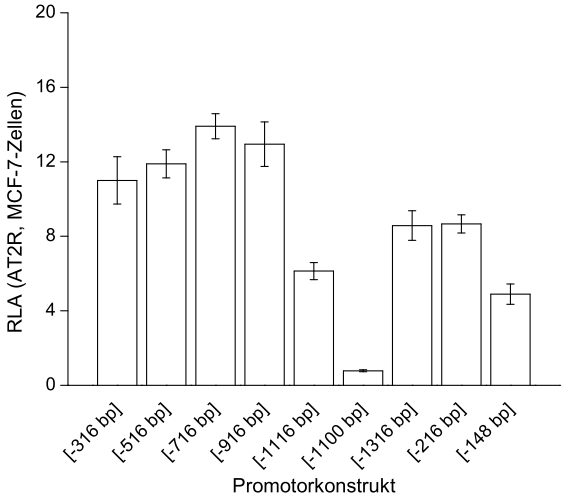


Abbildung 4.4: Promotorverhalten des humanen AT2R-Gens unter basalen Bedingungen. Epitheliale MCF-7-Zellen wurden mit unterschiedlich großen AT2R-Promotorkonstrukten für 48 Stunden transient transfiziert (x-Achse). Die relative Promotoraktivität des jeweiligen Konstrukts ist als Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen wiedergegeben (y-Achse).

In der Abbildung 4.4 ist die jeweilige Promotoraktivität der generierten AT2R-Promotorkonstrukte dargestellt. Die Aktivität der Konstrukte [-316 bp] bis [-916 bp] liegt in einem RLA-Bereich von 10 bis 15. Die Erweiterung der Promotorlänge im 5'-*upstream*-Bereich auf -1116 bp und schließlich auf -1316 bp führt zu einer Abnahme der Promotoraktivität auf einen RLA-Wert von 6 beziehungsweise 8. Das [-148 bp]-Konstrukt besteht nur aus dem Intron 1 und weist eine relative Promotoraktivität von 5 auf. Das [-216 bp]-Konstrukt enthält neben dem Intron 1 zusätzlich das Exon 1. Diese spezifische Verlängerung der Promotorregion resultiert in einer Zunahme der RLA auf einen Wert von 8 und ist damit vergleichbar mit der Aktivität des [-1316 bp]-Konstrukts. Das [-1100 bp]-Konstrukt verfügt in seiner Sequenz weder über das Intron 1 noch über das Exon 1 und besitzt mit einer RLA von 0,8 die geringste Promotoraktivität innnerhalb dieser Versuchreihe.

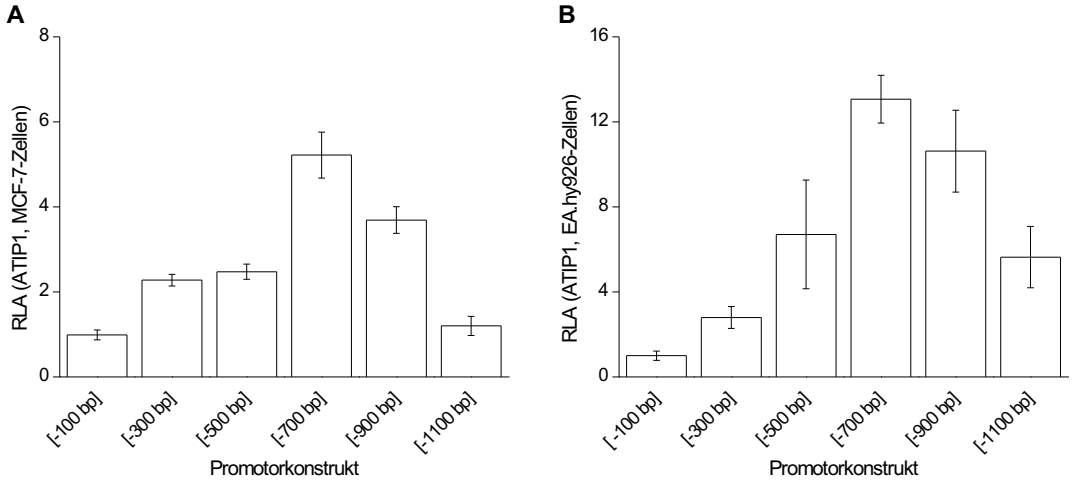


Abbildung 4.5: Promotorverhalten des ATIP1-Gens unter basalen Bedingungen. Epitheliale MCF-7-Zellen (A) und endotheliale EA.hy926-Zellen (B) wurden mit unterschiedlich großen ATIP1-Promotorkonstrukten für 48 Stunden transient transfiziert (x-Achse). Die Promotoraktivität der jeweiligen Konstrukte ist als Mittelwert der RLA aus vier unabhängigen Versuchen wiedergegeben (y-Achse).

In der Abbildung 4.5 ist das Verhalten des ATIP1-Promotors unter basalen Bedingungen in zwei unterschiedlichen Zellsystemen dargestellt. Die Transfektion der Zellen mit den sechs Konstrukten resultiert tendenziell in einem ähnlichen qualitativen Verlauf in MCF-7-Zellen (A) und in EA.hy926-Zellen (B). Die Promotoraktivität der ATIP1-Konstrukte ist in EA.hy926-Zellen jedoch im direkten Vergleich stärker als in MCF-7-Zellen. Die Größe des ATIP1-Promotors wurde jeweils um 200 bp im *upstream*-Bereich erweitert. Die Zunahme des Promotorbereichs von [-100 bp] auf [-700 bp] führt in beiden Zellsystemen zu einer Zunahme der Promotoraktivität. Die Erweiterung der Promotorlänge auf [-900 bp] beziehungsweise [-1100 bp] resultiert dagegen in einer Abnahme der Promotoraktivität.

4.3.1 Charakterisierung des regulativen *cis*-Elements in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens

Die Ergebnisse der basalen Transfektionsversuche weisen auf die Präsenz eines regulativen Elements in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Promotors hin. Für die detaillierte Analyse dieser Region wurde das [-216 bp]-Fragment zusätzlich in inverser Orientierung in den Reportervektor pGL3-*basic* kloniert und damit ein [-216 bp invers]-Konstrukt generiert (siehe Abbildung 3.4 in Kapitel 3.2.3.4). Anschließend wurden MCF-7-Zellen in parallelen Ansätzen für 48 Stunden mit dem [-216 bp]-Konstrukt der *sense* Orientierung und dem [-216 bp invers]-Konstrukt transient transfiziert. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurden die Zellen ebenfalls mit den [-1316 bp]-, [-1100 bp]- und [-148 bp]-Konstrukten transfiziert.

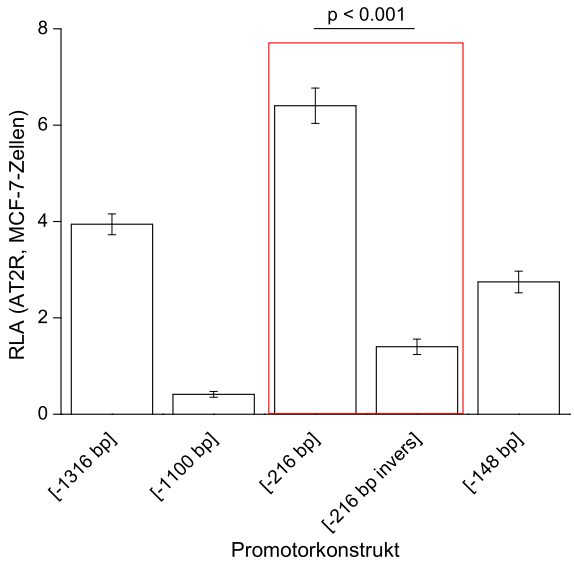


Abbildung 4.6: Untersuchung der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Promotors. Epitheliale MCF-7-Zellen wurden mit den dargestellten Promotorkonstrukten des humanen AT2R-Gens für 48 Stunden transient transfiziert (x-Achse). Die Promotoraktivität der einzelnen Konstrukte ist als mittlere RLA aus vier unabhängigen Versuchen dargestellt (y-Achse).

Die Abbildung 4.6 zeigt das Promotorverhalten der [-216 bp]-AT2R-Konstrukte in *sense* und inverser Orientierung. Die RLA des [-216 bp]-Konstrukts in der *sense* Orientierung beträgt 6,4, die des [-216 bp invers]-Konstrukts dagegen 1,2. Die inverse Orientierung der Exon-1-/Intron-1-Region resultiert in einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität um 80%. Das [-1100 bp]-Konstrukt weist mit einer RLA kleiner 1 auch innerhalb dieser Versuchsreihe die geringste Promotoraktivität auf.

4.3.2 Verifizierung des alternativen Transkriptionsstartpunkts in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens

Zur Ermittlung weiterer transkriptioneller Startpunkte des humanen AT2R-Gens wurde die Methode der RLM-5'-RACE modifiziert und eine sogenannte Luziferase-RLM-5'-RACE durchgeführt (Kapitel 3.2.2.8). Dafür wurden humane endotheliale EA.hy926-Zellen in separaten Ansätzen mit dem [-216 bp]-Konstrukt der *sense* Orientierung und mit dem [-1316 bp]-Konstrukt transient transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Diese fungierte als Ausgangsmaterial für die folgende RLM-5'-RACE. Die PCR-Produkte der *nested*-PCR wurden in den TOPO-TA-*cloning*-Vektor subkloniert, sequenziert und mittels BLAST-Analyse ausgewertet. In einem weiteren Versuchsansatz wurde das phRL-null-Plasmid kotransfiziert und die Promotoraktivität der beiden Konstrukte bestimmt.

In der Abbildung 4.7 ist der neu identifizierte transkriptionelle Startpunkt des humanen AT2R-Gens dargestellt. Die Abbildung A zeigt die jeweilige Promotoraktivität für das [-1316 bp]- und das [-216 bp]-Konstrukt. Die relative Promotoraktivität für das [-1316 bp]-Konstrukt beträgt 7 und für das [-216 bp]-Konstrukt 8,3. Die Promotorstärke beider Konstrukte ist vergleichbar mit früheren Ergebnissen. Beide Promotoren waren aktiv, so dass die Luziferase-RLM-5'-RACE durchgeführt werden konnte.

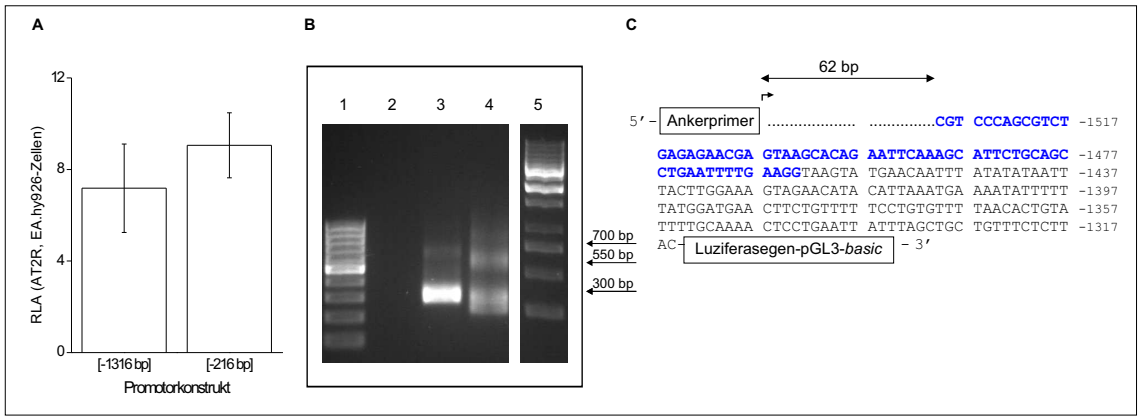


Abbildung 4.7: Darstellung des alternativen Transkriptionsstartpunktes des humanen AT2R-Gens, der mit Hilfe der Luziferase-RLM-5'-RACE identifiziert wurde. Endotheliale EA.hy926-Zellen wurden mit dem [-1316 bp]- beziehungsweise [-216 bp]-Konstrukt für 48 Stunden transient transfiziert. Die RNA der transfizierten Zellen wurde isoliert und als Ausgangsmaterial für die folgende RLM-5'-RACE verwendet. Die PCR-Produkte der RACE wurden subkloniert, sequenziert und anschließend bioinformatisch ausgewertet. A: Transfektion der beiden AT2R-Konstrukte [-1316 bp] und [-216 bp] (x-Achse). Die Promotoraktivität der beiden Konstrukte ist als mittlere RLA aus vier unabhängigen Versuchen dargestellt (y-Achse). B: Agarosegel der resultierenden PCR-Produkte der Luziferase-RLM-5'-RACE; 1: 100 bp DNA *ladder*, 2: Wasserkontrolle, 3: RLM-5'-RACE-Produkt aus EA.hy926-Zellen, die mit dem [-216 bp]-Konstrukt transfiziert wurden, 4: RLM-5'-RACE-Produkt aus EA.hy926-Zellen, die mit dem [-1316 bp]-Konstrukt transfiziert wurden, 5: 1 kb DNA *ladder*. C: Promotorregion des humanen AT2R-Gens mit dem Exon 1 (fett und blau), dem Intron 1 (schwarz) sowie mit dem neu identifizierten Transkriptionsstartpunkt (schwarzer Pfeil), der 62 bp *upstream* vom Exon 1 in der Basisstruktur des Luziferase-Reportervektors pGL3-*basic* lokalisiert ist.

Die Abbildung B zeigt das PCR-Produkt der *nested*-PCR für das [-216 bp]- und das [-1316 bp]-Konstrukt der RLM-5'-RACE. Für das [-216 bp]-Konstrukt konnte ein deutliches Amplifikat bei 300 bp und ein weiteres, schwächeres PCR-Produkt bei 700 bp detektiert werden. Die RLM-5'-RACE für das [-1316 bp]-Konstrukt führt ebenfalls zu einem PCR-Produkt bei etwa 300 bp und zu einem weiteren Amplifikat, das eine Größe von etwa 550 bp aufweist. Die Sequenzierung des subklonierten 300 bp großen PCR-Fragments des [-216 bp]-Konstrukts und die anschließende BLAST-Analyse führte zu der Identifikation eines weiteren Transkriptionsstartpunkts für das humane AT2R-Gen, der 62 bp *upstream* vom Exon 1 in der Basisstruktur des pGL3-*basic* Vektors lokalisiert ist (C). Projeziert auf die natürliche genomische AT2R-Sequenz befindet sich dieser Startpunkt 30 bp *upstream* der TATA-*box* des Gens. Durch die Subklonierung des 300 bp PCR-Amplifikats des [-1316 bp]-Konstrukts und die anschließende BLAST-Analyse konnte derselbe Startpunkt ermittelt und somit verifiziert werden. Zusätzlich wurde innerhalb dieser Analyse der Startpunkt bestimmt, der 1533 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt lokalisiert ist (siehe Kapitel 4.2). Die Subklonierung und Sequenzierung der größeren PCR-Fragmente, des 700 bp-Produkt für das [-216 bp]-Konstrukt und des 550 bp-Produkt für das [-1316 bp]-Konstrukt, ergaben keinen weiteren Startpunkt.

In der folgenden Abbildung sind die in dieser Arbeit identifizierten neben den bereits bekannten transkriptionellen Startpunkten des humanen AT2R-Gens zusammenfassend dargestellt. Die beiden publizierten Startpunkte wurden mit Hilfe der Primerextensionsanalyse ermittelt (Warnecke et al. 1999).

```
5'-TAAGCCACTG ACTTCAAAAT TCTCTAGCAC ATTTGTGGAA ACTTCATTTT TTTTGTTTGA GATTTATTTG -1707
   AATGAGCTGT TATGATTGGA GACAGTGAGA ATTTCAGATT AATGTTTTGC AGACAAAAAA AAACCTCTCT -1637

   GGAAAGCTGG CAAGGGTTCA TAAGTCAGCC CTAGAATTAT gTAGgTTGAA GGCTCCCAGT GGACaGACCA -1567

   AACAtataag aaggaaaCCA GAGATCTGGT GCTaTTACGT CCCAGCGTCT GAGAGAACGA GTAAGCACAG -1497
   AATTCAAAGC ATTCTGCAGC CTGAATTTTG AAGGTAAGTA TGAACAATTT ATATATAATT TACTTGGAAA -1427
   GTAGAACATA CATTAAATGA AAATATTTTT TATGGATGAA CTTCTGTTTT TCCTGTGTTT TAACACTGTA -1357
   TTTTGCAAAA CTCCTGAATT ATTTAGCTGC TGTTTCTCTT ACAGGAGTGT GTTTAGGCAC TAAGCAAGCT -1287
   GATTTATGAT AACTGCTTTA AACTTCAACA ACCAGTAAGT CTTCAAGTGG AATTTATTAT TGATTCTTTT -1217
   ...        ATATGAAGGG -3'
```

Abbildung 4.8: Darstellung der proximalen Promotorregion (GenBank Accession Nr. GI:51477555) sowie der transkriptionellen Startpunkte des humanen AT2R-Gens. Die in dieser Arbeit gefundenen Transkriptionsstartpunkte wurden mit Hilfe der RLM-5'-RACE ('a'; fett, rot sowie Pfeil) und der Luziferase-RLM-5'-RACE ('g'; fett, rot sowie Pfeil) identifiziert. Die Abbildung zeigt zusätzlich die Startpunkte von Warnecke et al. (1999) (fett und grün), die mittels Primerextensionsanalyse ermittelt wurden. Außerdem sind die TATA-*box* (fett und unterstrichen), die Exone 1 und 2 (fett und blau) sowie der Translationsstartpunkt 'ATG' (fett und rot) dargestellt.

4.3.3 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf den humanen AT2R-Promotor

Für das humane AT2R-Gen ist im Intron 1 der *single nucleotide polymorphism* (SNP) -G1332A (rs1403543) beschrieben (Ji et al. 2003), der sich 1332 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt befindet. In diesem Versuch wurde der Einfluss dieses SNPs auf die Transkription des humanen AT2R-Gens untersucht. Dafür wurde ein weiteres Konstrukt generiert, das sogenannte [-216-G bp]-Konstrukt, das an dieser Position das G-Allel enthält (siehe Abbildung 3.5 in Kapitel 3.2.3.4). Anschließend wurden neuronale KELLY-Zellen mit dem [-216-G bp]- und dem [-216-A bp]-Konstrukt in separaten Ansätzen unter basalen Stimulationsbedingungen für 48 Stunden transient transfiziert. Die Promotoraktivität der beiden Konstrukte wurde als RLA gemessen.

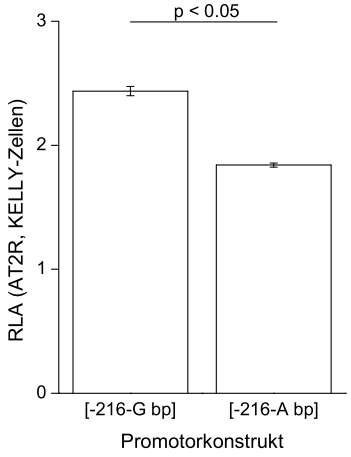


Abbildung 4.9: Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die Promotoraktivität des humanen AT2R-Gens. Neuronale KELLY-Zellen wurden entweder mit dem [-216-G bp]- oder dem [-216-A bp]-Konstrukt in separaten Ansätzen für 48 Stunden transient transfiziert (x-Achse). Die Promotoraktivität der beiden Konstrukte ist als mittlere RLA aus vier unabhängigen Versuchen dargestellt (y-Achse).

Die Promotoraktivität des [-216-G bp]-Konstrukts beträgt 2,4 und die des [-216-A bp]-Konstrukts 1,9 (Abbildung 4.9). Die Aktivität des [-216-G bp]-Konstrukts ist im Vergleich zu der Promotoraktivität des [-216-A bp]-Konstrukts signifikant um 33% stärker.

4.4 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch Östrogene

4.4.1 Bioinformatische Analyse des humanen AT2R- und ATIP1-Promotors

Die Promotorbereiche des humanen AT2R-Gens und des ATIP1-Gens wurden mit dem Programm MatInspector bioinformatisch auf die Präsenz östrogenresponsiver Elemente (EREs) untersucht. Zusätzlich wurde der Promotor des humanen *trefoil-faktor-1*-Gens (TFF1) analysiert, das innerhalb der Östrogenversuche als Positivkontrolle verwendet wurde.

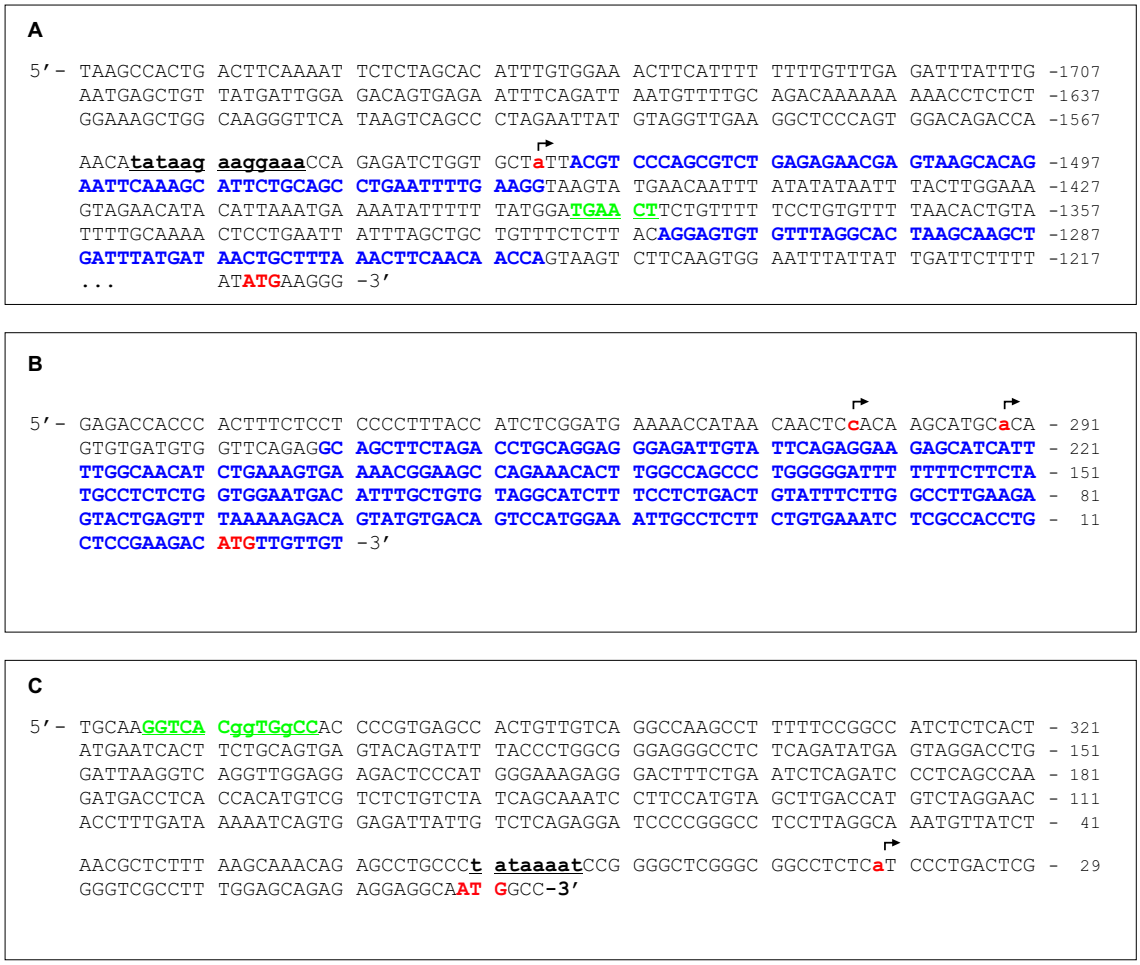


Abbildung 4.10: Bioinformatische Promotoranalyse des humanen AT2R-, ATIP1- und TFF1-Gens. Untersuchung der Promotoren auf die Existenz östrogenresponsiver Elemente (EREs) mit dem Programm MatInspector. A: 5'-Struktur des humanen AT2R-Promotors mit der TATA-*box* (schwarz und fett sowie unterstrichen), dem transkriptionellen Startpunkt 'a' (rot, fett und Pfeil), den Exonen 1 und 2 (blau und fett), einem halbseitigen steoridresponsiven Element (grün, fett und unterstrichen) und dem Translationsstartpunkt (rot und fett). B: 5'-Struktur des ATIP1-Promotors mit den beiden Transkriptionsstartpunkten 'c' und 'a' (rot, fett und Pfeil), dem Exon 1 (blau und fett) und dem Translationsstartpunkt (rot und fett). C: 5'-Struktur des TFF1-Promotors mit einem ERE (grün, fett und unterstrichen), der TATA-*box* (schwarz, fett und unterstrichen), dem Transkriptionsstartpunkt 'a' (rot, fett und Pfeil) und dem Translationsstartpunkt (rot und fett).

Die Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der bioinformatischen Voruntersuchung. Für den humanen AT2R-Promotor konnte ein halbseitiges steroidresponsives Element 5'-TGAACT-3' im Intron 1 ermittelt werden, das 1385 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt lokalisiert ist (A). Der Promotor des ATIP1-Gens verfügt dagegen weder über östrogenresponsive noch über andere steroidresponsive Elemente (B). Die Referenzuntersuchung des TFF1-Promotors ergibt ein klassisches ERE mit der Sequenz 5'-GGTCACggTGgCC-3' (Prest et al. 2002), das sich 430 bp *upstream* vom Translationsstart befindet (C).

4.4.2 Einfluss von E2 auf die transkriptionelle Regulation des TFF1-Gens

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss des weiblichen Hormons 17β-Östradiol (E2) auf die transkriptionelle Regulation des Referenzgens TFF1 auf mRNA-, Promotor- und Chromatinebene untersucht.

4.4.2.1 Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression des TFF1-Gens

Für die Erstellung einer Zeitkinetik der Östrogenwirkung wurden MCF-7-Zellen vor der Stimulation für 72 Stunden in steroid- und phenolrotfreiem Medium kultiviert, anschließend mit 10 nM E2 beziehungsweise mit dem Vehikel Ethanol (EtOH) inkubiert und nach 2, 4, 6, 8, 10, 24 und 48 Stunden geerntet. Nach der RNA-Isolation wurde die Expression der TFF1-mRNA mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf das Vehikel normalisiert.

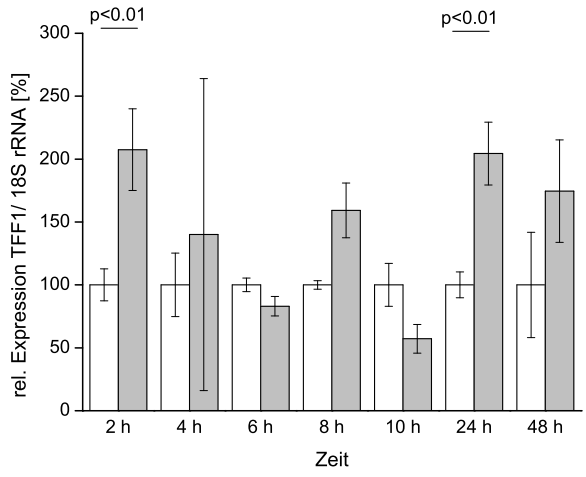


Abbildung 4.11: Zeitauflösende Darstellung des Östrogeneinflusses auf die TFF1-mRNA-Expression. Epitheliale MCF-7-Zellen wurden mit 10 nM E2 (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (x-Achse). Die TFF1-mRNA-Expression wurde gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf das Vehikel normalisiert (y-Achse).

Die Abbildung 4.11 zeigt den Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression des TFF1-Gens zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Abbildung verdeutlicht einen oszillierenden Verlauf der mRNA-Expression nach der einmaligen Stimulation mit E2. Die mRNA-Expression steigt im Vergleich zum Vehikel nach 2, 8 und 24 Stunden an und nimmt zwischenzeitlich zu den Zeitpunkten 6 und 10 Stunden ab. Die stärkste Expression wird nach 2 und 24 Stunden gemessen, wo das TFF1-Transkriptionsniveau durch den E2-Einfluss im Vergleich zu der Kontrolle verdoppelt ist.

4.4.2.2 Einfluss von E2 auf den TFF1-Promotor

Das Hormon 17β-Östradiol ist kommerziell als wasserlösliches und als ethanollösliches Produkt erhältlich. Um einen Lösungsmitteleinfluss auf die transkriptionelle Regulation des TFF1-Gens und somit auch auf die beiden Zielgene auszuschließen, wurde die Promotoraktivität eines 568 bp großen TFF1-Promotorkonstrukts unter dem Einfluss von 10 nM wasser- beziehungsweise ethanollöslichem E2 und des entsprechenden Vehikels ermittelt. Zusätzlich wurde der Einfluss von E2 unter der Kotransfektion eines ERα-Expressionsvektors auf den TFF1-Promotor untersucht. Zu diesem Zweck wurden MCF-7-Zellen mit dem jeweiligen E2 sowie mit dem entsprechenden Vehikel inkubiert und für 48 Stunden mit den folgenden Konstrukten transient transfiziert beziehungsweise kotransfiziert (siehe auch Abbildung 3.7 in Kapitel 3.2.3.4):

1) [-568 bp]-TFF1-Promotorkonstrukt/pGL3-*basic*
2) [-568 bp]-TFF1-Promotorkonstrukt/pGL3-*basic* + ERα/pSG5–Expressionsvektor
3) [-568 bp]-TFF1-Promotorkonstrukt/pGL3-*basic* + pSG5–Leervektor
4) pGL3-*basic*–Leervektor + ERα/pSG5–Expressionsvektor
5) pGL3-*basic*–Leervektor + pSG5–Leervektor

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Wirkung des wasser- beziehungsweise ethanollöslichen E2 und des entsprechenden Solvents auf die endogene mRNA-Expression des TFF1-Gens untersucht, die mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf die jeweilige Kontrolle normalisiert wurde. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in den Abbildungen 4.12 A bis D zusammengefasst.

Die Abbildung 4.12 A zeigt den Einfluss von ethanolgelöstem E2 auf das Promotorverhalten des TFF1-Gens sowie die Wirkung des kotransfizierten ERα-Expressionsvektors. Die Stimulation der Zellen mit diesem E2 resultiert im Vergleich zum Vehikel in einer signifikanten Reduktion der TFF1-Promotoraktivität des [-568 bp]-Konstrukts (Faktor 7). Die Kotransfektion des ERα-Expressionsvektors führt sowohl unter der E2- als auch unter Vehikelinkubation zu einer Aktivierung der TFF1-Promotoraktivität. Der direkte Vergleich zwischen der E2- und der Vehikelstimulation zeigt jedoch auch nach der Kotransfektion des ERα-Expressionsvektors eine signifikante Reprimierung der TFF1-Promotoraktivität unter E2-Stimulation. Die Kotransfektion des pSG5-Leervektors führt unter der E2-Stimulation gegenüber der Kontrolle erneut zu einer signifikanten Reduktion der TFF1-Promotoraktivität (Faktor 2,25). Die Inkubation mit E2 resultiert dagegen in einer Aktivierung der Promotoraktivität des Leervektors pGL3-*basic* nach der Kotransfektion des ERα-Expressionsvektors (Faktor 5). Die Kotransfektion der beiden Leervektoren pSG5 und pGL3-*basic* zeigt unter der E2-Stimulation ebenfalls eine Zunahme der Promotoraktivität des Leervektors pGL3-*basic* (Faktor 1,5).

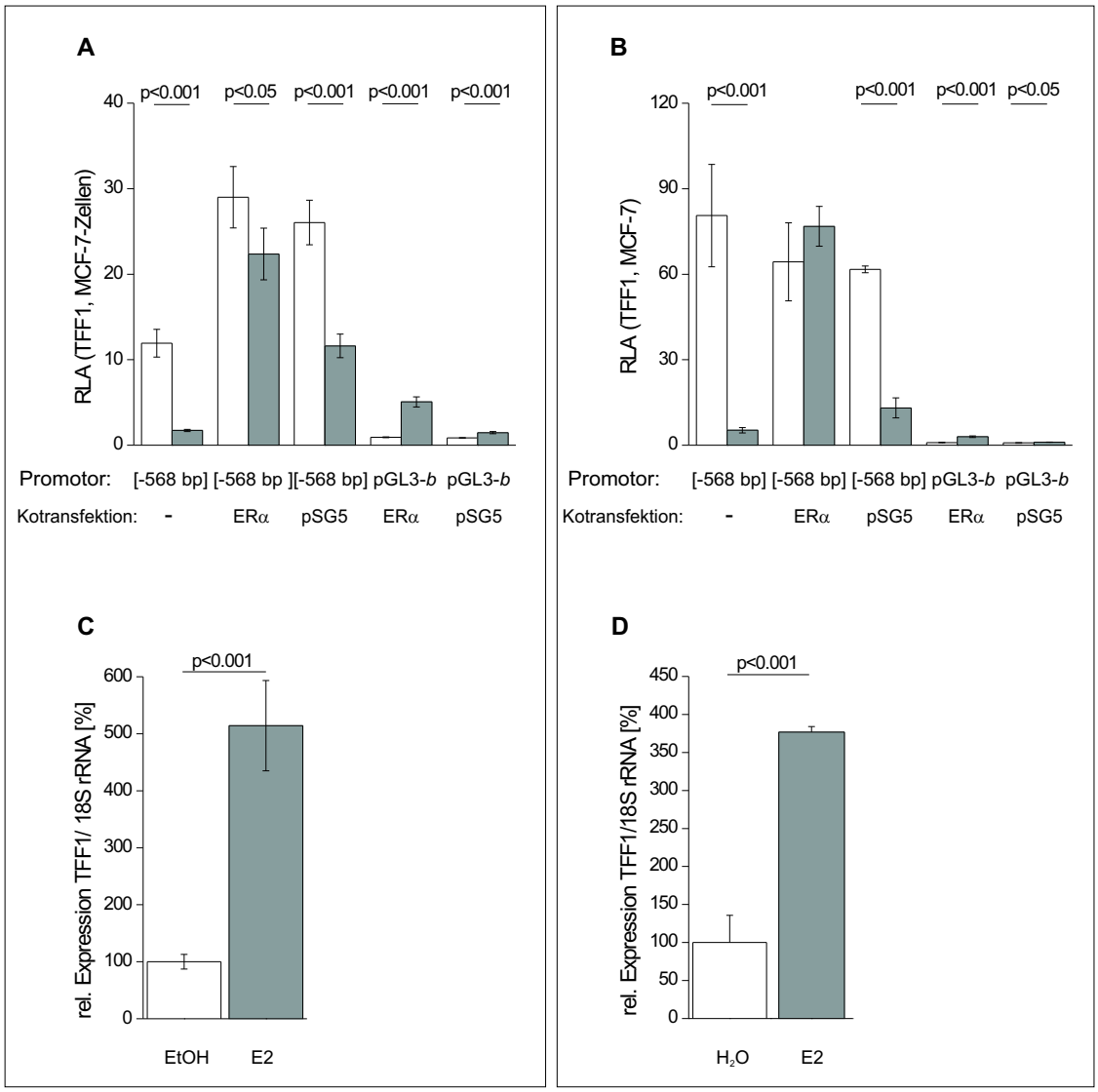


Abbildung 4.12: Einfluss von ethanol- beziehungsweise wasserlöslichem E2 und dem entsprechenden Vehikel auf die Transkription des TFF1-Gens. MCF-7-Zellen wurden für 48 Stunden mit den dargestellten Konstrukten transient transfiziert beziehungsweise kotransfiziert (A und B, x-Achse). Anschließend wurde die Promotoraktivität als mittlere RLA aus vier unabhängigen Versuchen ermittelt (A und B, y-Achse). Die Zellen wurden vor der Transfektion mit ethanollöslichen E2 (A und C, graue Säulen) beziehungsweise wasserlöslichem E2 (B und D, graue Säulen) und dem entsprechenden Solvent (weiße Säulen) stimuliert. Die Abbildungen C und D zeigen die mRNA-Expression des TFF1-Gens unter dem Einfluss von E2 (graue Säulen) normalisiert auf die entsprechende Ethanol- (C) beziehungsweise Wasserkontrolle (D).

Die Abbildung 4.12 B zeigt das Ergebnis der gleichen Transfektionsbedingungen, jedoch unter der Stimulation mit dem wasserlöslichen E2. Die Inkubation der Zellen mit dem wasserlöslichen E2 resultiert im Vergleich zum Vehikel ebenfalls in einer signifikanten Abnahme der Promotoraktivität des [-568 bp]-TFF1-Konstrukts. Durch die Stimulation der Zellen mit dem wasserlöslichen E2 wird die TFF1-Promotoraktivität um das Fünfzehnfache reprimiert. Die Kotransfektion des ERα-Expressionsvektors führt unter der Stimulation mit E2 zu einem Anstieg der TFF1-Promotoraktivität. Der direkte Vergleich zwi-

schen E2 und dem Vehikel zeigt auch innerhalb dieser Versuchsgruppe keinen signifikanten Einfluss des Hormons auf die Promotorstärke des TFF1-Gens. Die Kotransfektion des pSG5-Leervektors führt unter der E2-Inkubation erneut zu einer signifikanten Reprimierung der TFF1-Promotoraktivität (Faktor 4,7). Die Stimulation der Zellen mit E2 zeigt dagegen nach der Kotransfektion des ERα-Expressionsvektor eine signifikanten Zunahme der Promotoraktivität des Leervektors pGL3-*basic* (Faktor 3,3). Die Kotransfektion beider Leervektoren resultiert unter der Inkubation mit E2 in einer schwachen jedoch signifikanten Zunahme der Promotoraktivität des Leervektors pGL3-*basic* (Faktor 1,3).

Die Messung der endogenen TFF1-mRNA-Expression zeigt im Vergleich zu den Ergebnissen der Reporterassays gegensätzliche Effekte (Abbildungen 4.12 C und D). Die Inkubation der Zellen mit dem ethanol- und wasserlöslichen E2 resultiert gegenüber der jeweiligen Kontrolle in einem signifikanen Anstieg der mRNA-Expression.

Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse wurde der Einfluss von ethanolgelöstem E2 auf ein weiteres TFF1-Promotorkonstrukt ermittelt, das eine Promotorgröße von 1300 bp und somit im Vergleich zu dem [-586 bp]-Konstrukt einen größeren Promotorbereich aufweist (Kapitel 3.2.3.4). MCF-7-Zellen wurden unter der Inkubation mit ethanollöslichem E2 beziehungsweise Vehikel in separaten Ansätzen mit dem [-568 bp]- und dem [-1300 bp]-Konstrukt für 48 Stunden transient transfiziert. Anschließend wurde die Promotoraktivität der beiden Konstrukte ermittelt. Zusätzlich wurde für beide Ansätze die endogene mRNA-Expression des TFF1-Gens als Kontrollansatz gemessen.

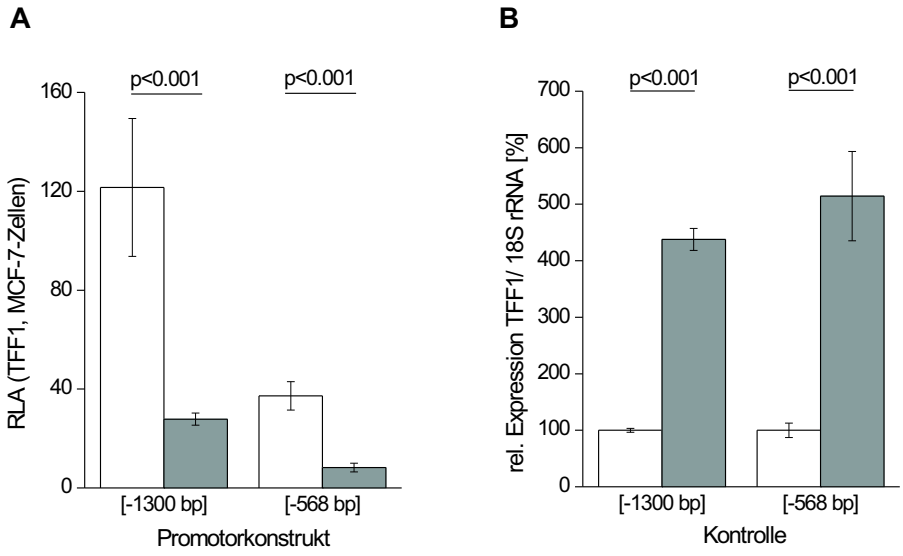


Abbildung 4.13: Darstellung des E2-Einflusses auf das TFF1-Gen. MCF-7-Zellen wurden unter der Stimulation mit ethanollöslichem E2 (graue Säulen) respektive Vehikel (weiße Säulen) mit den beiden TFF1-Promotorkonstrukten [-1300 bp] und [-568 bp] für 48 Stunden transient transfiziert. A: Die Promotoraktivität der beiden Konstrukte (x-Achse) wurde unter dem E2-Einfluss als RLA gemessen (y-Achse). B: Die endogene mRNA-Expression des TFF1-Gens aus beiden Versuchsansätzen wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf das Vehikel normalisiert.

Die Transfektion der Zellen mit beiden TFF1-Promotorkonstrukten führt unter der E2-Stimulation im Vergleich zu der Vehikelkontrolle zu einer 78%igen Reduktion der TFF1-Promotoraktivität (Abbildung 4.13 A). Die Untersuchung des endogenen TFF1-Transkriptionsspiegels beider Versuchsansätze zeigt, dass die Zellinkubation mit E2 gegenüber der Kontrolle jeweils in einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression resultiert (Faktor 4) (B).

4.4.2.3 Einfluss von E2 auf die Regulation des TFF1-Gens innerhalb des Chromatinkontextes

Der Einfluss von E2 auf die Regulation der TFF1-Transkription innerhalb des Chromatinkontextes wurde mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) untersucht. Humane MCF-7-Zellen wurden für 72 Stunden in steroid- und phenolrotfreiem Medium kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit 10 nM E2 beziehungsweise Vehikel stimuliert. Der Versuch wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.9 durchgeführt. Die immunopräzipitierte DNA wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen β-Aktin quantifiziert. Die Berechnung der relativen Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den TFF1-Promotor erfolgte entsprechend den Gleichungen 3.4 und 3.5. Die Kontrollversuche des ChIPs wurden nach den Angaben in Kapitel 3.2.2.9 durchgeführt. In einem parallelen Versuchsansatz wurde die endogene mRNA-Expression des TFF1-Gens unter identischen Versuchsbedingungen ermittelt und mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert.

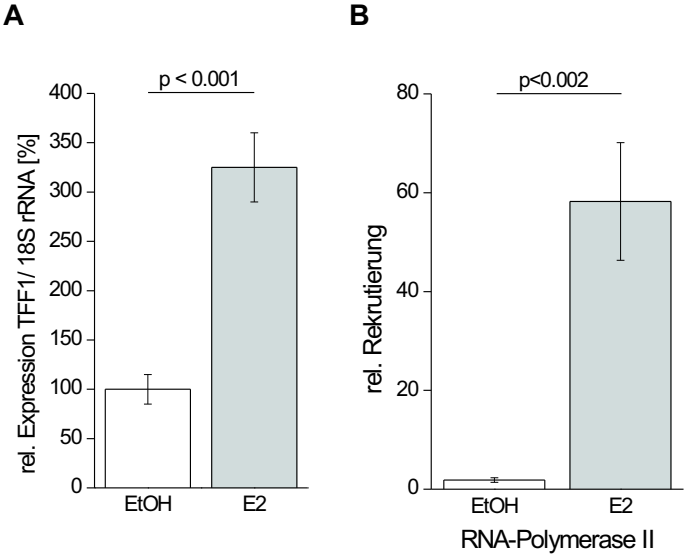


Abbildung 4.14: Der Einfluss von E2 auf die TFF1-mRNA-Expression (A) und auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor des TFF1-Gens (B). MCF-7-Zellen wurden 24 Stunden mit 10 nM E2 (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression mittels *real-time*-PCR ermittelt (A). Im zweiten Versuchsansatz wurde die Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt und die immunopräzipitierte DNA mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen β-Aktin quantifiziert (B).

Die Stimulation der Zellen mit E2 resultiert im Vergleich zu der Kontrolle in einem signifikanten Anstieg des TFF1-Transkriptionsniveaus auf 340% (Abbildung 4.14 A). Gleichzeitig führt die E2-Inkubation gegenüber der Kontrolle zu einer dreißigfach stärkeren Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den TFF1-Promotor (B).

4.4.3 Einfluss von E2 auf den AT2R- und ATIP1-Promotor

Für die folgende Versuchsreihe wurden die Zellen vor der Stimulation entsprechend der Angaben in Kapitel 3.5 vorbehandelt und anschließend mit 10 nM ethanolgelöstem E2 beziehungsweise Vehikel inkubiert. Der E2-Einfluss auf den humanen AT2R-Promotor wurde in MCF-7-Zellen untersucht, die für 48 Stunden mit den folgenden Deletionsmutanten transient transfiziert wurden: [-1316 bp], [-1100 bp], [-148 bp], [-216 bp] sowie [-216 bp invers]. Die entsprechende Analyse des ATIP1-Promotors wurde in EA.hy926-Zellen durchgeführt, die für 48 Stunden mit dem [-100 bp]-, [-300 bp]-, [-500 bp]-, [-700 bp]-, [900 bp]- beziehungsweise [-1100 bp]-Konstrukt transient transfiziert wurden.

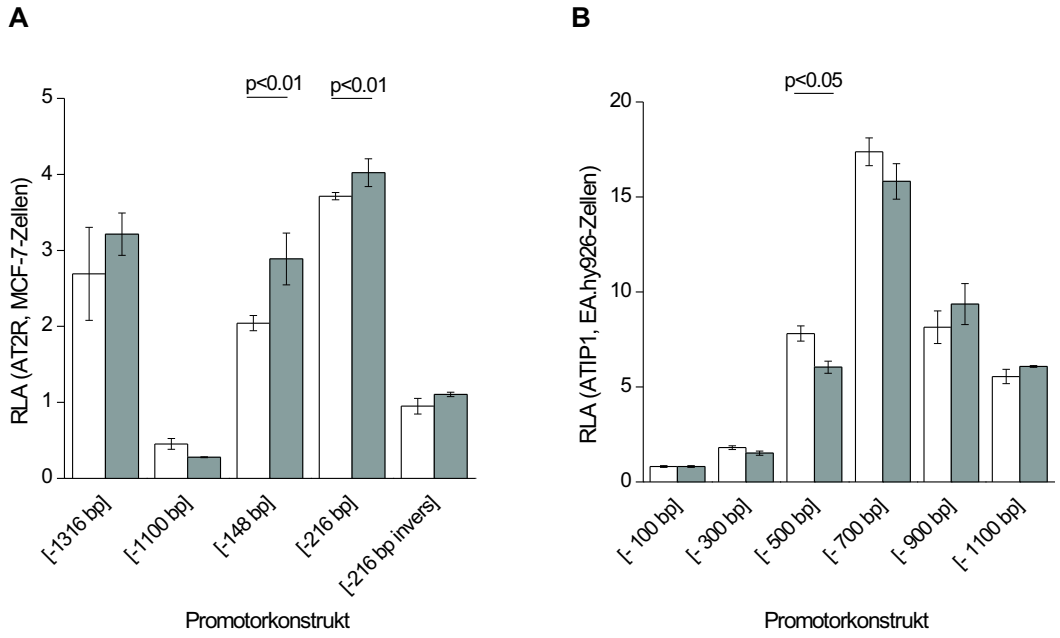


Abbildung 4.15: E2-Einfluss auf den humanen AT2R- und ATIP1-Promotor. A: Humane MCF-7-Zellen wurden mit den dargestellten Promotordeletionsmutanten (x-Achse) für 48 Stunden transient transfiziert. Die Zellen wurden mit 10 nM E2 (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) stimuliert. B: Der Einfluss von 10 nM E2 (graue Säulen) respektive Vehikel (weiße Säulen) auf den ATIP1-Promotor wurde in humanen EA.hy926-Zellen untersucht, die für 48 Stunden mit den gezeigten Konstrukten (x-Achse) transient transfiziert wurden. Die Promotoraktivität der jeweiligen Konstrukte wurde als RLA gemessen (y-Achse). Die Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte aus vier unabhängigen Versuchen.

Das Ergebnis in der Abbildung 4.15 A zeigt, dass die E2-Stimulation gegenüber der Kontrolle in einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität der beiden AT2R-Promotorkonstrukte [-148 bp] und [-216 bp] resultiert. E2 hat jedoch keinen Einfluss auf die Promotoraktivität der AT2R-Konstrukte [-1316 bp], [-1100 bp] und [-216 bp invers].

Die Transfektion der EA.hy926-Zellen mit den oben dargestellten ATIP1-Promotorkonstrukten resultiert unter der Stimulation mit E2 in einer signifikanten Reprimierung der Promotoraktivität des [-500 bp]-Konstrukts verglichen mit dem Vehikel (Abbildung 4.15 B). Die Promotoraktivität der anderen ATIP1-Konstrukte bleibt durch die E2-Inkubation dagegen unbeeinflusst.

4.4.4 Geschlechtsspezifische Transkription des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens *in vivo*

Mit Hilfe der folgenden Versuchen wurde die geschlechtsspezifische endogenene mRNA-Expression des AT2R- und des ATIP1-/ATP50-Gens *in vivo* ermittelt. Die Expression wurde im gesunden und im kranken Tiermodell sowie in humanen Gewebeproben untersucht.

4.4.4.1 Endogene Expression des AT2R- und des ATBP50-Gens in gesunden murinen Herzen

Die geschlechtsspezifische mRNA-Expression des AT2R- und ATBP50-Gens wurde in männlichen und weiblichen Herzgeweben von unbehandelten, normotensiven Wistar-Ratten untersucht (siehe Kapitel 3.1.15). Das Gewebe wurde nach Vorhof und Herzkammer getrennt analysiert. Die RNA aus beiden Kompartimenten wurde isoliert und die endogene mRNA-Expression mittels *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert.

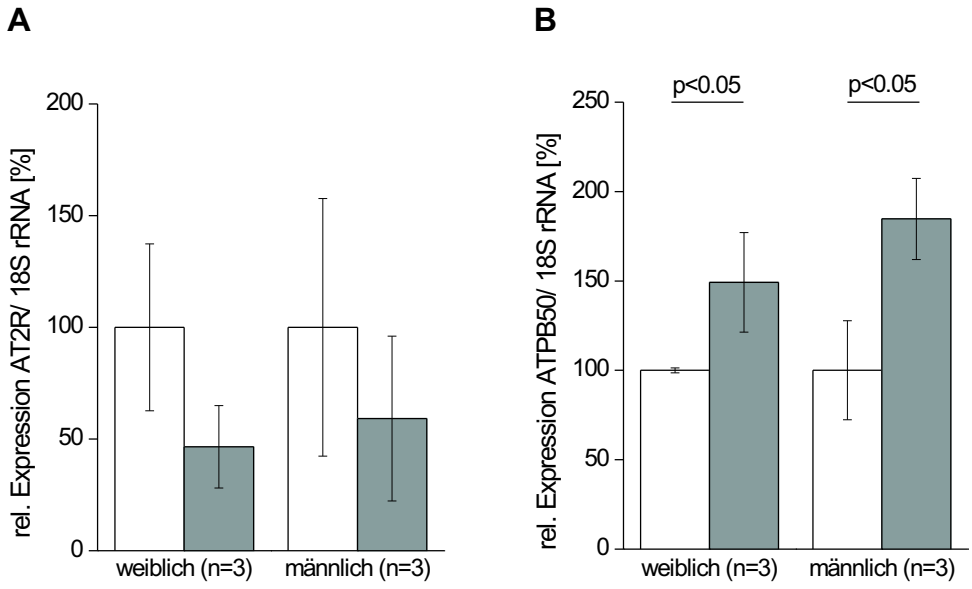


Abbildung 4.16: Geschlechtsspezische mRNA-Expression des AT2R- (A) und ATBP50-Gens (B) im Vorhof (weiße Säulen) und in der Herzkammer (graue Säulen) von weiblichen und männlichen normotensiven Wistar-Ratten.

Das Ergebnis in der Abbildung 4.16 A zeigt, dass die mRNA-Expression des murinen AT2R-Gens weder im Vorhof noch in der Herzkammer der Tiere geschlechtsspezifisch reguliert wird. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression bezüglich Vorhof und Herzkammer detektiert werden.

Das Geschlecht hat ebenfalls weder im Vorhof noch in der Herzkammer einen Einfluss auf die Transkription des ATBP50-Gens (Abbildung 4.16 B). Die Untersuchung bezüglich der Expression im Vorhof und in der Herzkammer zeigt jedoch, dass das ATBP50-Gen sowohl in männlichen als auch in weiblichen Tieren in diesen Kompartimenten unterschiedlich stark exprimiert wird. In den Vorhöfen der weiblichen und der männlichen Tiere ist die ATBP50-mRNA-Expression im Vergleich zu der Herzkammer deutlich geringer.

4.4.4.2 Endogene Expression des AT2R- und des ATIP1-Gens in gesunden humanen Herzen

In der folgenden Versuchsreihe wurde die endogene mRNA-Expression des humanen AT2R- und ATIP1-Gen in Herzbiopsien des linken Ventrikels gesunder explantierter Spenderherzen ermittelt (siehe Kapitel 3.1.14). Zu den Spendern zählten drei Frauen und sechs Männer der Altersgruppe unter 40 Jahren sowie sieben Frauen und sieben Männer der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre. Die endogenen Transkriptionsspiegel der beiden Zielgene wurden mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen HPRT quantifiziert.

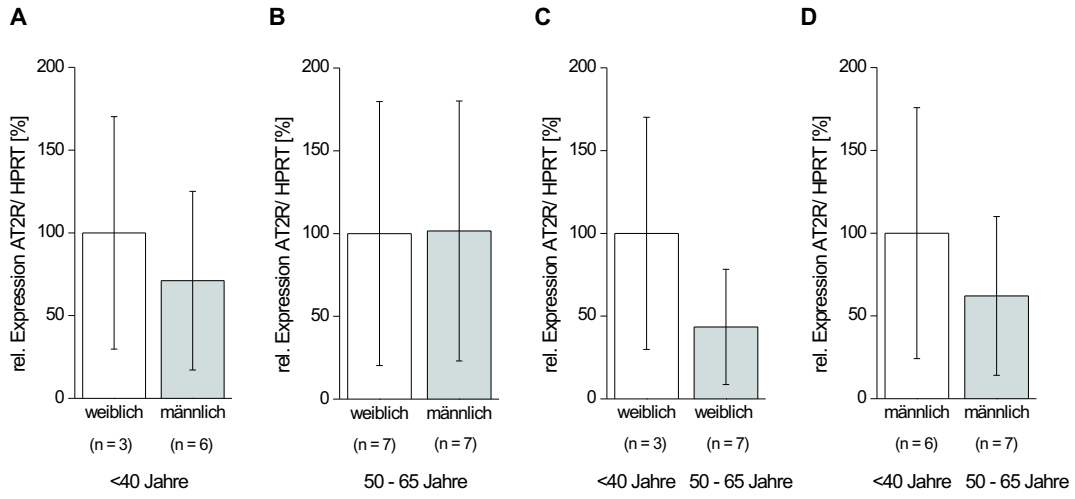


Abbildung 4.17: Endogene mRNA-Expression des humanen AT2R-Gens im Herzgewebe des linken Ventrikels gesunder Männer und Frauen. A: Frauen (weiße Säule) versus Männer (graue Säule) der Altersgruppe unter 40 Jahren. B: Frauen (weiße Säule) versus Männer (graue Säule) der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre. C: Frauen jünger als 40 Jahre (weiße Säule) versus Frauen der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre (graue Säule). D: Männer jünger als 40 Jahre (weiße Säule) versus Männer der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre (graue Säule). Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen HPRT quantifiziert.

In der Abbildung 4.17 ist die endogene mRNA-Expression des humanen AT2R-Gens im Herzgewebe des linken Ventrikels der Untersuchungsgruppen dargestellt. Die Transkription des AT2R-Gens erfolgt bei Frauen und bei Männern sowohl in der Altersgruppe unter 40 Jahren (A) als auch in der Altersgruppe von 50 bis 65 Jahren (B) nicht unterschiedlich und ist damit vom Geschlecht unabhängig. Die Versuchsreihe zeigt außerdem, dass das Alter bei Frauen (C) und Männern (D) keine regulative Rolle auf die mRNA-Expression des humanen AT2R-Gens spielt.

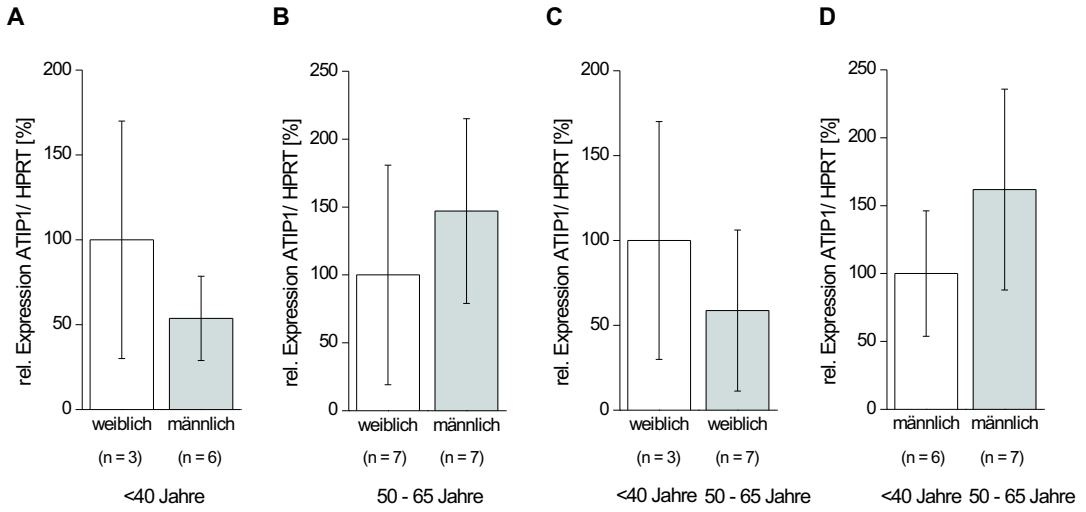


Abbildung 4.18: Endogene mRNA-Expression des ATIP1-Gens im Herzgewebe des linken Ventrikels gesunder Männer und Frauen. A: Frauen (weiße Säule) versus Männer (graue Säule) der Altersgruppe unter 40 Jahren. B: Frauen (weiße Säule) versus Männer (graue Säule) der Altersgruppe 50 bis 65 Jahren. C: Frauen jünger 40 Jahre (weiße Säule) versus Frauen der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre (graue Säule). D: Männer jünger 40 Jahre (weiße Säule) versus Männer der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre (graue Säule).

Die Abbildung 4.18 zeigt das endogene Transkriptionsniveau des ATIP1-Gens in Herzgewebeproben von derselben Spendergruppe. Die mRNA-Expression des ATIP1-Gens ist bei Frauen und Männern der Altergruppe unter 40 Jahren (A) und der Altergruppe 50 bis 65 Jahren (B) nicht geschlechtsspezifisch. Die Untersuchung bezüglich des Alters zeigt ebenfalls weder bei Frauen (C) noch bei Männern (D) einen Einfluss auf die ATIP1-mRNA-Expression.

4.4.4.3 Endogene Expression des murinen AT2R- und des ATBP50-Gens in pathologischen Herzen

In diesem Versuch wurde die endogene mRNA-Expression des murinen AT2R- und ATBP50-Gens im Herzgewebe von männlichen Wistar-Ratten ermittelt, denen ein Herzinfarkt (HI) mittels koronarer Ligatur induziert wurde. Der Tierversuch wurde freundlicher Weise von Dr. E. Kaschina durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.14). Innerhalb der Versuchsreihe wurden zusätzlich *sham*-operierte Tiere als Kontrollen mitgeführt. Eine Tiergruppe wurde 24 Stunden nach der Induktion des Herzinfarktes für sieben Tage einmal täglich mit dem AT2R-Agonisten Compound 21 (Comp21) behandelt. Die Dosierung betrug jeweils 0,03 mg/kg. Nach der Isolierung der Gesamtherz-RNA wurde die mRNA-Expression der beiden Zielgene gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA mit Hilfe der *real-time*-PCR quantifiziert. Es wurden jeweils zwei Tiere pro Untersuchungsgruppe analysiert.

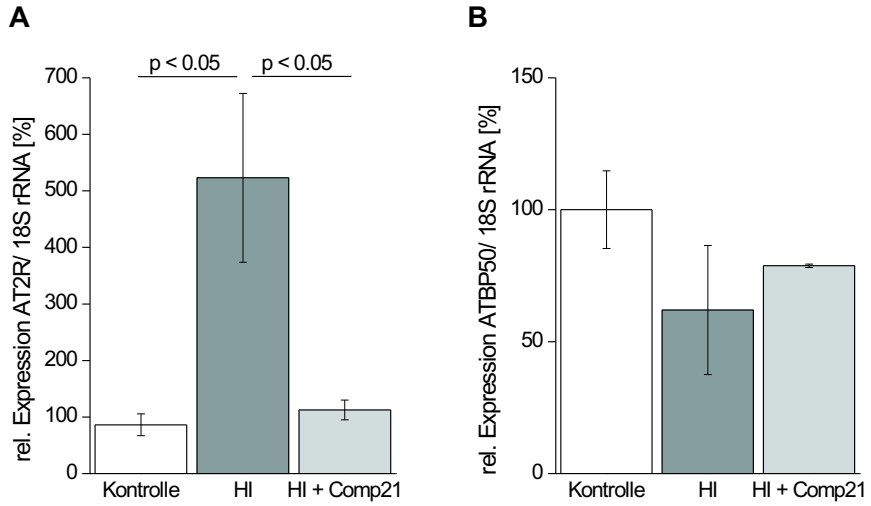


Abbildung 4.19: Endogene mRNA-Expression des murinen AT2R-Gens (A) und des ATBP50-Gens (B) in Herzgewebeproben von *sham*-operierten Tieren (weiße Säulen), nach Induktion eines Herzinfarktes (dunkelgraue Säulen) sowie nach Induktion eines Herzinfarktes und der anschließenden Behandlung mit Compound 21 (hellgraue Säulen). Die mRNA-Expression wurde jeweils mittels *real-time*-PCR bestimmt.

Die Induktion eines Herzinfarktes in den Tieren führt im Vergleich zu den *sham*-operierten Tieren zu einer sechsfachen Zunahme der AT2R-mRNA-Transkription (Abbildung 4.19 A). Die anschließende Behandlung der Tiere mit dem AT2R-Agonisten Comp21 resultiert gegenüber der Expression der HI-induzierten Tieren in einer signifikanten Reprimierung des AT2R-Transkriptionsspiegels um den Faktor 4,6 und ist vergleichbar mit der Expression der gesunden Kontrolltiere.

Der Herzinfarkt führt zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der mRNA-Expression des ATBP50-Gens gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 4.19 B). Die Behandlung der infarktinduzierten Tiere mit Comp21 führt im Vergleich zu den Infarkttieren zu einer Zunahme der ATBP50-mRNA-Expression, die jedoch ebenfalls nicht signifikant ist.

4.4.4.4 Endogene Expression des humanen AT2R- und des ATIP1-Gens in pathologischen Herzen

Die endogene mRNA-Expression des AT2R- und ATIP1-Gens wurde in humanen Herzgewebeproben von zwei männlichen und zwei weiblichen Patienten ermittelt, die Symptome einer Herzinsuffizienz aufwiesen. Bei den Gewebeproben handelte es sich um Biopsien aus dem Septum (siehe Kapitel 3.1.14). Nach der Isolierung der RNA wurde die mRNA-Expression der beiden Zielgene mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf die gesunde Kontrolle normalisiert.

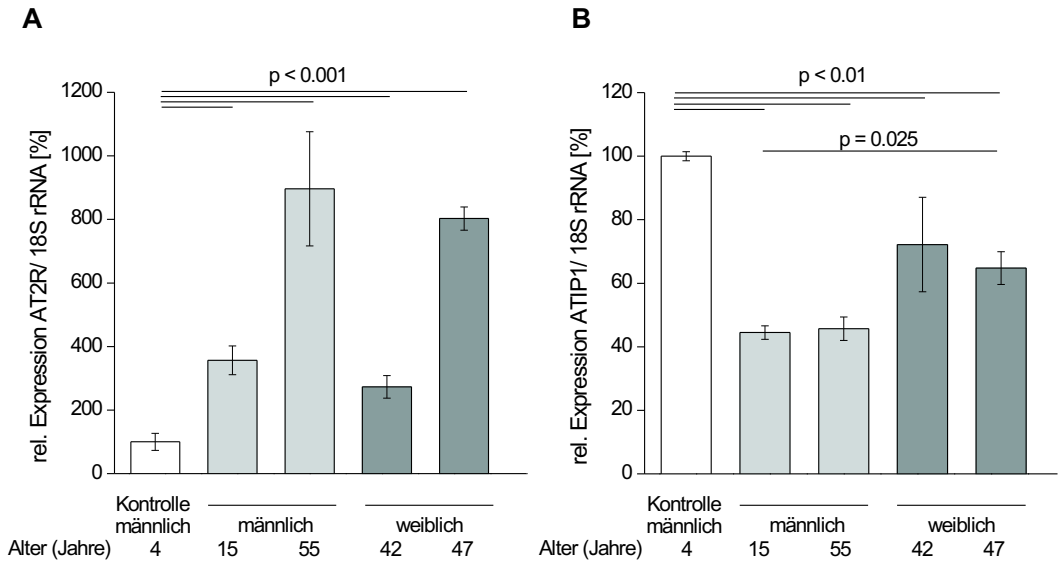


Abbildung 4.20: Endogene mRNA-Expression des humanen AT2R-Gens (A) und des ATIP1-Gens (B) in Herzgewebeproben von Patienten unterschiedlichen Alters mit einer Herzinsuffizienz. Die mRNA-Expression wurde in einer gesunden männlichen Kontrolle (weiße Säule), in männlichen (hellgraue Säulen) und weiblichen (dunkelgraue Säulen) Herzbiopsien mit Hilfe der *real-time*-PCR ermittelt und auf die gesunde Kontrolle standardisiert. Zusätzlich ist in der Abbildung das Alter der Patienten dargestellt.

Der Transkriptionsspiegel des AT2R-Gens ist in den Herzgewebeproben der männlichen und weiblichen Patienten im Vergleich zu der gesunden männlichen Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 4.20 A). Das Geschlecht selbst hat dabei jedoch keinen Einfluss auf die AT2R-mRNA-Expression. Die ATIP1-mRNA wird dagegen in den kranken Gewebeproben gegenüber der gesunden Kontrolle signifikant reprimiert (Abbildung 4.20 B). Im Vergleich zu der Expression in den männlichen Proben ist die ATIP1-mRNA-Expression in den weiblichen Gewebeproben signifikant erhöht.

4.5 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch PARP-1

Das folgende Kapitel zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich des PARP-1-Einflusses auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens. Dieser wurde auf mRNA-, Promotor- und Chromatinebene analysiert. Die Ergebnisse wurden zusätzlich *in vivo* in homozygoten PARP-1-*knockout*-Mäusen (*KO*) und in Wildtypmäusen (WT) untersucht.

4.5.1 Einfluss der PARP-Inhibierung auf die mRNA-Expression des AT2R- und ATIP1-Gens

Für die Analyse des PARP-1-Einflusses auf die endogene AT2R-mRNA-Expression wurden neuronale KELLY-Zellen für acht Stunden mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) stimuliert. Die entsprechende Untersuchung des ATIP1-Gens wurde in endothelialen EA.hy926-Zellen durchgeführt, die für zwölf Stunden mit 10 mM 3-AB inkubiert wurden. Anschließend wurden die EA.hy926-Zellen ein zweites Mal mit 10 mM 3-AB stimuliert und nach weiteren 12 Stunden geerntet. Die mRNA-Expression der beiden Zielgene wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf das Vehikel normalisiert.

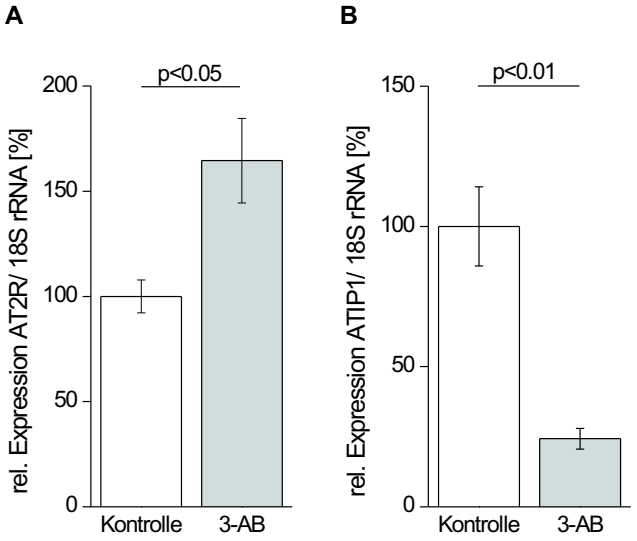


Abbildung 4.21: Einfluss der PARP-Inhibierung auf die endogene mRNA-Expression des humanen AT2R- (A) und ATIP1-Gens (B). A: Neuronale KELLY-Zellen wurden für 8 Stunden mit 30 mM 3-AB (graue Säule) beziehungsweise Vehikel (weiße Säule) stimuliert. B: Endotheliale EA.hy926-Zellen wurden zweimal für jeweils 12 Stunden mit 10 mM 3-AB (graue Säule) beziehungsweise Vehikel (weiße Säule) inkubiert. Die mRNA-Expression der beiden Gene wurde mittels *real-time*-PCR bestimmt und auf die Kontrolle normalisiert.

Die pharmakologische Inhibierung der enzymatischen PARP-Aktivität resultiert in den KELLY-Zellen gegenüber der Vehikelkontrolle in einer 1,6-fachen Zunahme der AT2R-mRNA-Expression (Abbildung 4.21 A). Die ensprechende Ermittlung des ATIP1-Transkriptionsspiegels zeigt dagegen einen gegenteiligen Effekt: die mRNA-Expression des ATIP1-Gens wird durch die 3-AB-Stimulation signifikant um 80% reduziert (B).

4.5.2 Einfluss des PARP-1-*knockouts* auf die mRNA-Expression des AT2R- und ATBP50-Gens

Zur Validierung der pharmakologischen Ergebnisse wurde das endogene Expressionsniveau der beiden Zielgene in embryonalen Mausfibroblastenzellen (MEFs) von homozygoten PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen ermittelt.

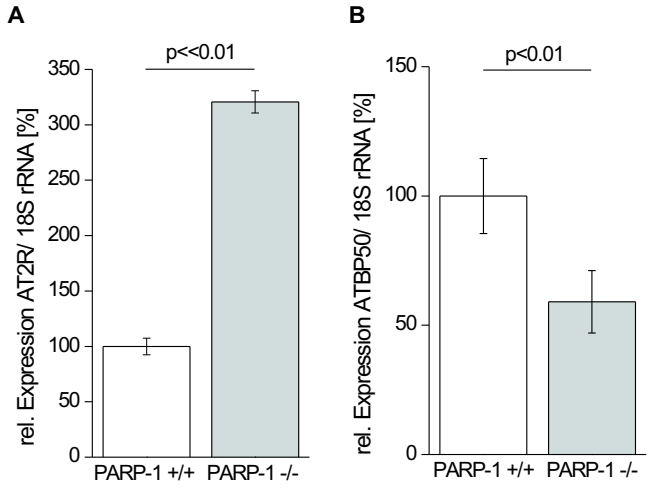


Abbildung 4.22: Endogene mRNA-Expression des AT2R-Gens (A) und des ATBP50-Gens (B) in MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- (graue Säulen) und WT-Tieren (weiße Säulen). Die Expression wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf den WT normalisiert.

Der homozygote *knockout* des PARP-1-Gens resultiert mit einem Faktor von 3 in einer signifikanten Zunahme der AT2R-mRNA-Expression (Abbildung 4.22 A). Der Transkriptionsspiegel des ATBP50-Gens wird durch den *knockout* dagegen signifikant um 40% reduziert (B).

4.5.3 Einfluss der PARP-1-mRNA-Repression auf die mRNA-Expression des ATIP1-Gens

EA.hy926-Zellen wurden für 24 Stunden mit 2 μM siRNA gegen die humane PARP-1-mRNA beziehungsweise mit einer Kontroll-siRNA transient transfiziert. Anschließend wurde die RNA aus den transfizierten Zellen isoliert und die mRNA-Expression des ATIP1-Gens mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression des PARP-1-Gens nach der Inhibierung gemessen.

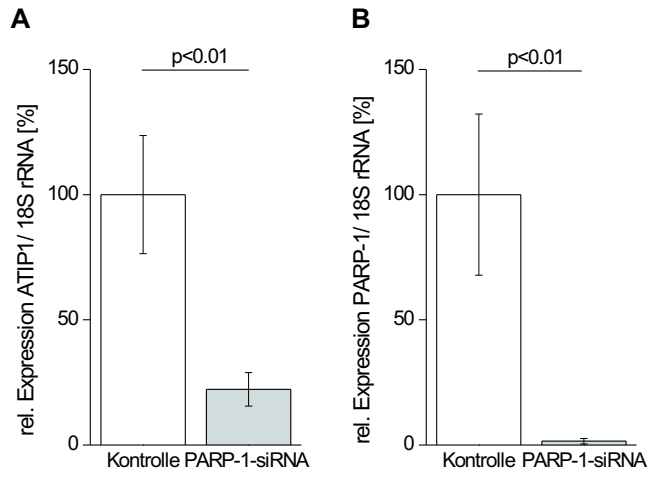


Abbildung 4.23: mRNA-Expression des ATIP1-Gens (A) und des PARP-1-Gens (B) nach der Inhibierung der PARP-1-mRNA mittels siRNA (graue Säulen) beziehungsweise nach der Stimulation mit der Kontroll-siRNA (weiße Säulen). Die Expression der mRNA wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf die Kontrolle normalisiert.

Die Repression der PARP-1-mRNA durch die siRNA führt im Vergleich zu der Kontrolle zu einer signifikanten Reduktion der ATIP1-mRNA-Expression um 80% (Abbildung 4.23 A). Die PARP-1-Expression selbst ist durch die Stimulation der Zellen mit der siRNA zum Zeitpunkt der Ernte um 98% inhibiert.

4.5.4 Einfluss von PARP-1 auf das Promotorverhalten des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens

Die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch PARP-1 wurde in einer weiteren Versuchsreihe zusätzlich auf der Promotorebene untersucht. Dafür wurden neuronale KELLY-Zellen mit den AT2R-Promotorkonstrukten [-1316 bp], [-1100 bp], [-216 bp] und [-148 bp] transient transfiziert und nach 24 Stunden für weitere 8 Stunden mit 30 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel stimuliert. MEFs von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen wurden in einem weiteren Versuchsansatz mit den gleichen AT2R-Deletionsmutanten transient transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. In einem dritten Experiment wurden die Zellen für 24 Stunden mit den oben beschriebenen Konstrukten transient transfiziert und mit einem PARP-1-Expressionsvektor kotransfiziert. Die Promotoraktivität wurde jeweils über ein luziferasebasiertes Vektorsystem gemessen.

Die Transfektion der KELLY-Zellen mit den AT2R-Konstrukten führt unter der Stimulation mit 3-AB im Vergleich zum Vehikel zu einer signifikanten Promotoraktivierung des [-1316 bp]-, [-148 bp]- und [-216 bp]-Konstrukts. Den stärksten Einfluss hat die PARP-Inhibierung auf das [-148 bp]-Konstrukt, bei dem eine Verdopplung der Promotoraktivität registriert wurde. Wie bereits in den Versuchen zuvor, spielt die Exon-1-/Intron-1-Region für die Promotorstärke des AT2R-Gens eine entscheidende Rolle. Ist diese Region nicht in der Promotorstruktur enthalten, wie bei dem [-1100 bp]-Konstrukt, hat die PARP-Inhibierung keinen weiteren Effekt auf den AT2R-Promotor (Abbildung 4.24 A). Die Promotoruntersuchung in den PARP-1-*KO*- und den WT-Zellen verifiziert die Ergebnisse der pharmakologischen PARP-Inhibierung. Der PARP-1-*knockout* führt zu einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität des [-1316 bp]-, [-148 bp]- und [-216 bp]-Konstrukts. Das [-1100 bp]-Konstrukt bleibt durch den *knockout* von PARP-1 dagegen auch innerhalb dieses Versuches unbeeinflusst (Abbildung 4.24 B). Die Kotransfektion der KELLY-Zellen mit einem PARP-1-Expressionsvektor resultiert in einem gegenteiligen Effekt. Die Promotoraktivität des [-1316 bp]-, [-148 bp]- und [-216 bp]-Konstrukts wird unter der Kotransfektion des PARP-1-Expressionsvektors signifikant reprimiert (Abbildung 4.24 C). Auf das [-1100 bp]-Konstrukt hat die Kotransfektion des PARP-1-Expressionsvektors keine weitere Auswirkung.

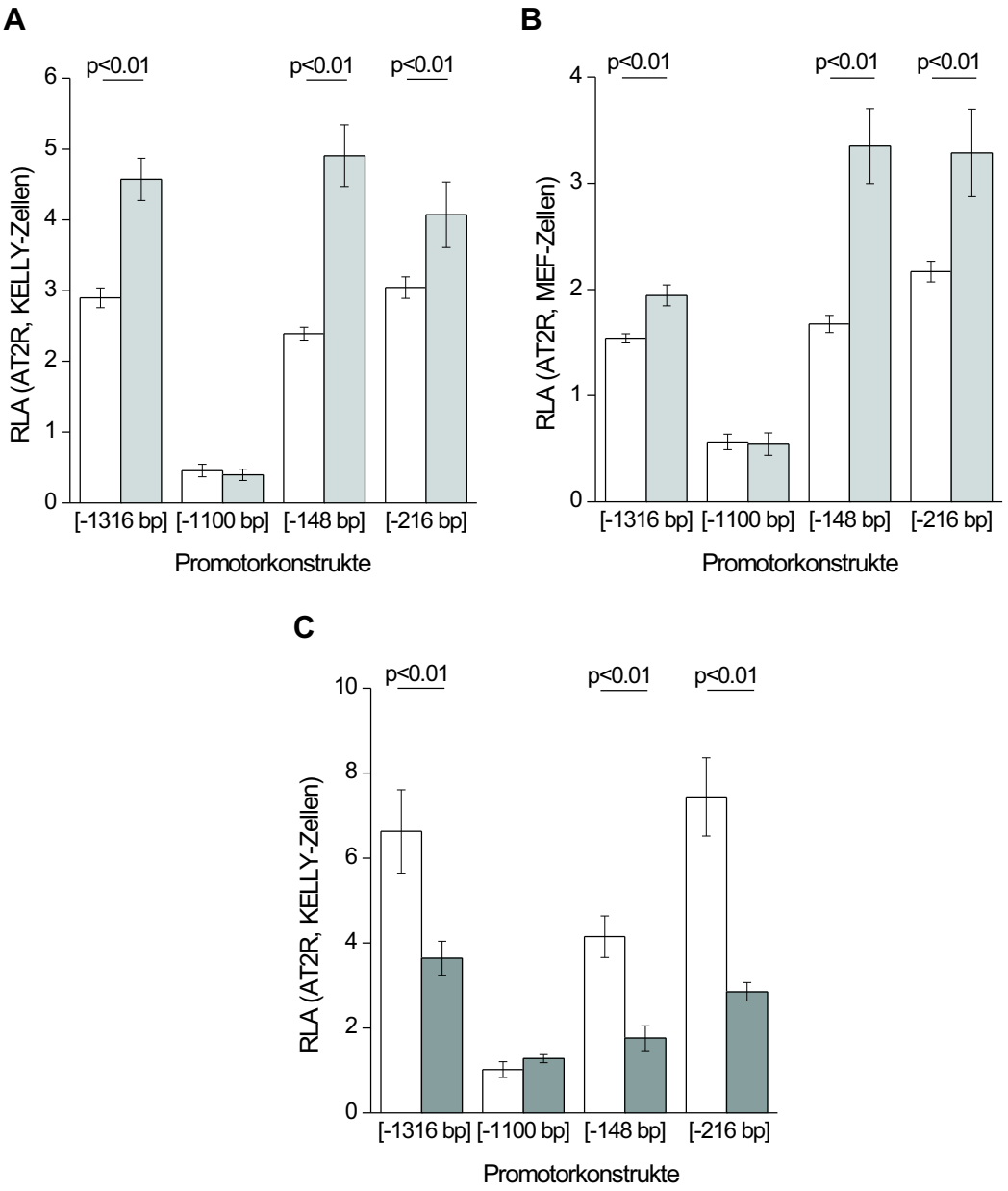


Abbildung 4.24: Einfluss von PARP-1 auf die Promotoraktivität des AT2R-Gens. A: Neuronale KELLY-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen AT2R-Konstrukten (x-Achse) transient transfiziert und anschließend für 8 Stunden mit 30 mM 3-AB (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) inkubiert. B: MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- (graue Säulen) und WT-Mäusen (weiße Säulen) wurden für 24 Stunden mit den gleichen AT2R-Konstrukten transient transfiziert. C: KELLY-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen AT2R-Deletionsmutanten transient transfiziert und mit einem PARP-1-Expressionsvektor (graue Säulen) beziehungsweise einem Kontrollvektor (weiße Säulen) kotransfiziert. Anschließend wurde die Promotoraktivität der einzelnen AT2R-Konstrukte ermittelt (y-Achse).

Der Einfluss von PARP-1 auf den Promotor des ATIP1-Gens wurde in endothelialen EA.hy926-Zellen sowie in MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen untersucht.

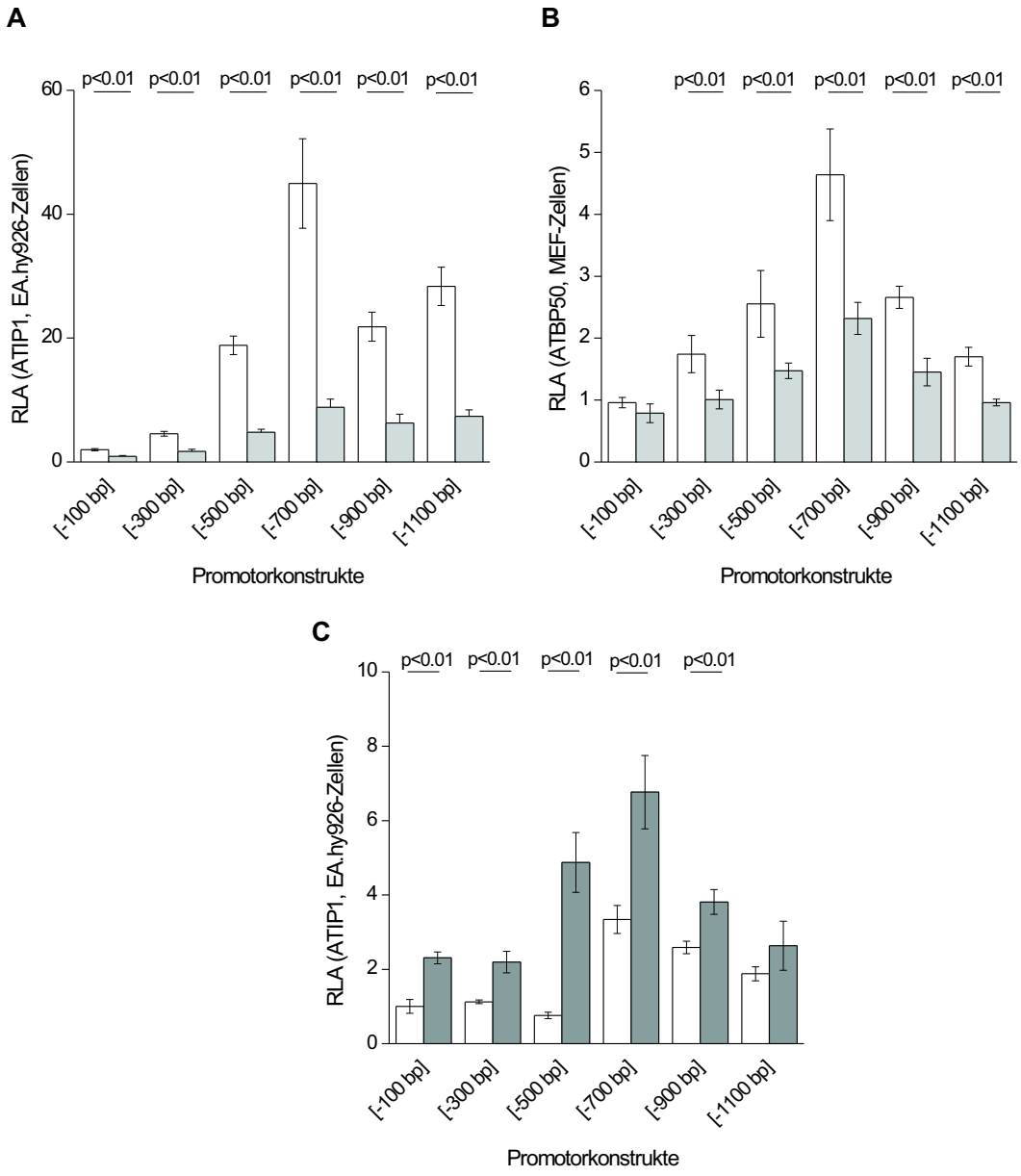


Abbildung 4.25: Der Einfluss von PARP-1 auf die Promotoraktivität des ATIP1-/ATBP50-Gens. A: Endotheliale EA.hy926-Zellen wurden für 24 Stunden mit den angegebenen ATIP1-Deletionsmutanten (x-Achse) transient transfiziert und anschließend für weitere 24 Stunden mit 10 mM 3-AB (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) stimuliert. B: MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- (graue Säulen) beziehungsweise WT-Mäusen (weiße Säulen) wurden für 24 Stunden mit den dargestelleten ATIP1-Deletionsmutanten transient transfiziert. C: EA.hy926-Zellen wurden für 24 Stunden mit den ATIP1-Promotorkonstrukten transient transfiziert und mit einem PARP-1-Expressionsvektor (graue Säulen) beziehungsweise Kontrollvektor (weiße Säulen) kotransfiziert. Anschließend wurde die Promotoraktivität der einzelnen ATIP1-Konstrukte ermittelt (y-Achse).

Humane EA.hy926-Zellen wurden für 24 Stunden mit den folgenden ATIP1-Promotorkonstrukten transient transfiziert: [-100 bp], [-300 bp], [-500 bp], [-700 bp], [-900 bp] und [-1100 bp] und anschließend für weitere 24 Stunden mit 10 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel stimuliert. Die *knockout*- beziehungsweise WT-Zellen wurden mit den gleichen

Deletionsmutanten transient transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Promotorverhalten des ATIP1-Gens unter der Kotransfektion eines PARP-1-Expressionsvektors in EA.hy926-Zellen ermittelt. Dafür wurden die Zellen mit den oben beschriebenen ATIP1-Promotorkonstrukten transient transfiziert und nach 24 Stunden geerntet. Die Promotoraktivität wurde jeweils als relative Luziferaseaktivität aus vier unabhängigen Versuchen bestimmt.

In der Abbildung 4.25 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Unter der Inhibierung der enzymatischen PARP-Aktivität mittels 3-AB wird die Promotoraktivität der sechs untersuchten ATIP1-Konstrukte signifikant reprimiert (A). Der *knockout* des PARP-1-Gens führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Promotorstärke der Mutanten [-300 bp] bis [-1100 bp] (B). Die Aktivität des [-100 bp]-Konstrukts wird durch den *knockout* des PARP-1-Gens jedoch nicht weiter beeinflusst. Die Kotransfektion der EA.hy926-Zellen mit einem PARP-1-Expressionsvektor resultiert dagegen in einer signifikanten Zunahme der ATIP1-Promotorstärke der Konstrukte [-100 bp] bis [-900 bp]. Die Überexpression des PARP-1-Gens hat jedoch keinen Einfluss auf die Promotoraktivität des [-1100 bp]-Konstrukts.

4.5.5 Einfluss von PARP-1 auf die Regulation des AT2R- und ATIP1-Gens innerhalb des Chromatinkontexts

In diesem Versuch wurde der Einfluss der PARP-Inhibierung mittels 3-AB auf die Rekrutierung von TBP an den AT2R-Promotor sowie auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II und TBPs an den Promotor des ATIP1-Gens ermittelt. Für die Untersuchung bezüglich des AT2R-Gens wurden neuronale KELLY-Zellen für 8 Stunden mit 30 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel stimuliert und anschließend für das ChIP-Experiment formaldehydfixiert. Für die Analyse des ATIP1-Promotors wurden EA.hy926-Zellen verwendet, die für 24 Stunden mit 10 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel inkubiert und danach formaldehydfixiert wurden. Der weitere Versuch erfolgte entsprechend der Angaben in Kapitel 3.2.2.9. Nach Durchführung der Chromatin-Immunopräzipitation wurde die relative Rekrutierung der RNA-Polymerase II beziehungsweise TBPs an die Promotoren der entsprechenden Zielgene mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen die Rekrutierung von TBP für das AT2R-Gen beziehungsweise der RNA-Polymerase II für das ATIP1-Gen an den Promotor des *housekeeping*-Gens β-Aktin quantifiziert und nach den Gleichungen 3.4 sowie 3.5 ausgewertet.

Die Inhibierung der enzymatischen PARP-Aktivität mit dem Wirkstoff 3-AB führt zu einer signifikanten Zunahme der Rekrutierung von TBP an den AT2R-Promotor (Abbildung 4.26 A). Die Immunopräzipitation gegen PARP-1 zeigt außerdem, dass PARP-1 aufgrund der pharmakologischen Hemmung weniger Protein-DNA-Interaktionen mit dem AT2R-Promotor eingeht (B).

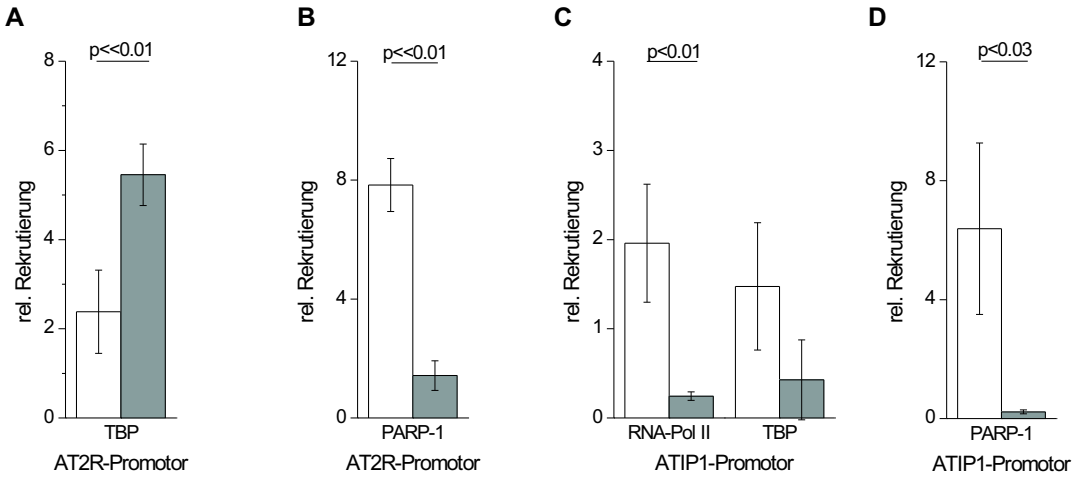


Abbildung 4.26: Einfluss der PARP-Inhibierung auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II, TBPs und PARP-1 an die Promotoren des AT2R- und ATIP1-Gens. A und B: Neuronale KELLY-Zellen wurden für 8 Stunden mit 30 mM 3-AB (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) stimuliert. Anschließend wurde die relative Rekrutierung von TBP (A) beziehungsweise PARP-1 (B) am AT2R-Promotor mittels ChIP ermittelt. C und D: Endotheliale EA.hy926-Zellen wurden für 24 Stunden mit 10 mM 3-AB (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) inkubiert. Die relative Rekrutierung der RNA-Polymerase II und TBPs (C) beziehungsweise von PARP-1 (D) an den ATIP1-Promotor wurde nach Durchführung eines ChIP-Experimentes bestimmt.

In endothelialen EA.hy926-Zellen führt die Inkubation der Zellen mittels 3-AB mit einem Faktor von 10 zu einer signifikanten Reduktion der RNA-Polymerase II-Rekrutierung an den ATIP1-Promotor. Auf die Rekrutierung des Proteins TBP hat die PARP-Inhibierung zu dem Zeitpunkt der Protein-DNA-Fixierung einen tendenziellen, jedoch keinen signifikanten Einfluss (Abbildung 4.26 C). Der Kontrollansatz zeigt, dass die PARP-Inhibierung zu einer signifikanten Abnahme der PARP-1-ATIP1-Wechselwirkung führt (D).

Die IP wurde zusätzlich gegen die Kontrollen IgG, Sepharose, Timp 1 für die AT2R-Analyse sowie Timp 3 für die ATIP1-Untersuchung durchgeführt. Die Kontrollergebnisse erfüllten die Kriterien, die in Kapitel 3.2.2.9 aufgeführt sind.

4.5.6 Einfluss von PARP-1 auf das AT2R-Gen unter AT2R-Aktivierung

MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen wurden 8 Stunden selektiv mit den folgenden Wirkstoffen behandelt: 0,1 μM Angiotensin II (Ang II), 10 μM Irbesartan (Irb), 0,1 μM Ang II + 10 μM Irb sowie 1 μM Compound 21 (Comp21). Für die Ermittlung des Ang II-vermittelten Effekts unter der Inhibierung des AT1R wurden die Zellen 30 Minuten vor der Ang II-Stimulation mit Irb inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Die mRNA-Expression des murinen AT2R-Gens wurde gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA mit Hilfe der *real-time*-PCR quantifiziert und auf das jeweilige Vehikel normalisiert.

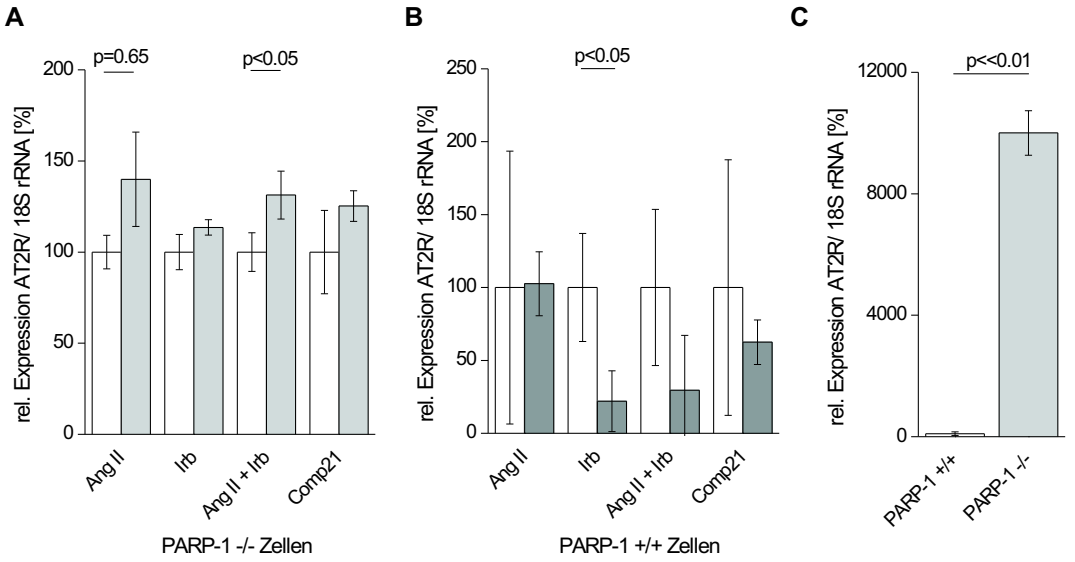


Abbildung 4.27: mRNA-Expression des AT2R-Gens in MEF-Zellen von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen. A: MEFs von PARP-1-*KO*-Mäusen wurden für 8 Stunden mit Ang II, Irb, Ang II + Irb, Comp21 (graue Säulen) beziehungsweise Vehikel (weiße Säulen) stimuliert. B: MEFs von PARP-1-WT-Mäusen wurden für 8 Stunden mit Ang II, Irb, Ang II + Irb, Comp21 (graue Säulen) respektive Vehikel (weiße Säulen) inkubiert. C: Endogene mRNA-Expression des murinen AT2R-Gens in den WT-Zellen (PARP-1 +/+) und den *KO*-Zellen (PARP-1 -/-).

Die Inkubation der PARP-1-*KO*-Zellen mit Ang II resultiert mit einem Faktor von 1,4 in einer tendenziellen, jedoch in keiner signifikanten Zunahme des AT2R-Transkriptionsspiegels (Abbildung 4.27 A). Die Stimulation der Zellen mit Irb beziehungsweise Comp21 hat keinen signifikanten Einfluss auf die AT2R-mRNA-Expression. Die AT2R-Aktivierung mit
Ang II + Irb bewirkt einen Anstieg der mRNA-Expression um 30%. Die Abbildung 4.27 B zeigt die entsprechenden Ergebnisse in PARP-1-WT-Zellen unter identischen Stimulationsbedingungen. Die Inkubation mit Irb resultiert in einer Reduktion der AT2R-mRNA-Expression um 75%. Die Stimulation der Zellen mit den Wirkstoffen Ang II, Ang II + Irb sowie Comp21 führt zu keiner signifikanten Änderung der Expression gegenüber den jeweiligen Vehikelkontrollen. In der Abbildung 4.27 C ist die endogene mRNA-Expression des AT2R-Gens in den *KO*-Zellen respektive WT-Zellen dargestellt. Der *knockout* des PARP-1-Gens resultiert in einer drastischen Zunahme der AT2R-mRNA-Expression.

4.5.7 Einfluss des PARP-1-*knockouts* auf den AT2R-Promotor unter AT2R-Aktivierung

MEF-Zellen von PARP-1-*KO*-Mäusen wurden mit den AT2R-Promotorkonstrukten [- 1316 bp], [- 1100 bp], [- 216 bp] und [- 148 bp] für 24 Stunden transient transfiziert. Die Zellen wurden danach für 8 Stunden mit den Wirkstoffen 0,1 μM Ang II, 10 μM Irb, 0,1 μM Ang II + 10 μM Irb sowie 1 μM Comp21 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet

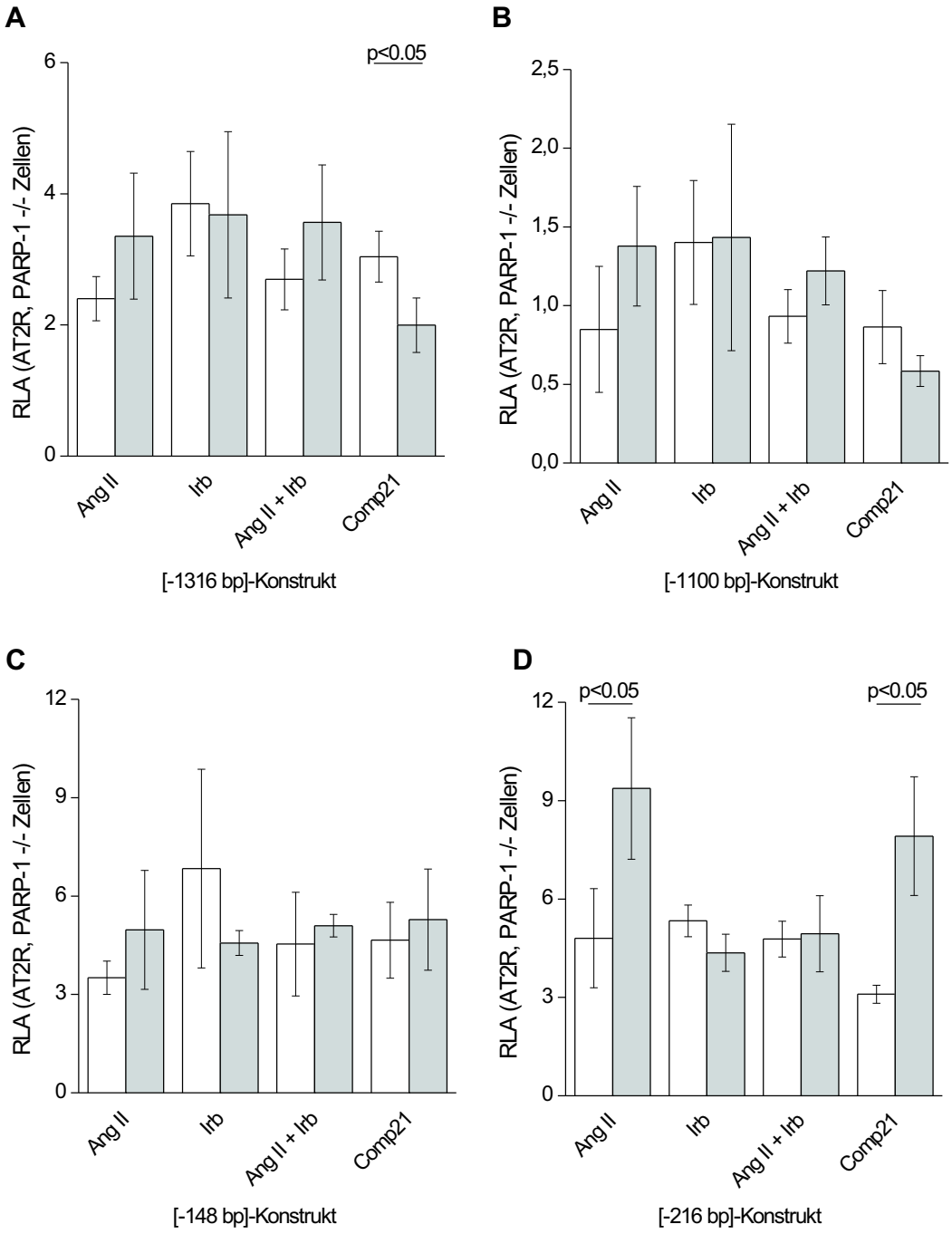


Abbildung 4.28: Promotorverhalten des AT2R-Gens in PARP-1-*KO*-Zellen unter AT2R-Aktivierung. Die Zellen wurden mit den AT2R-Konstrukten [-1316 bp] (A), [-1100 bp] (B), [-148 bp] (C) und [-216 bp] (D) für 24 Stunden transient transfiziert und danach für 8 Stunden mit Ang II, Irb, Ang II + Irb sowie Comp21 (graue Säulen) respektive Vehikelkontrollen (weiße Säulen) stimuliert. Anschließend wurde die Promotoraktivität über ein luziferasebasiertes Vektorsystem der einzelnen Konstrukte ermittelt (y-Achse).

und die Promotoraktivität ermittelt.

Die Abbildung 4.28 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Die AT2R-Aktivierung mit den dargestellten Wirkstoffen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Promotoraktivität

des [-1316 bp]-, [-1100 bp]- und [-148 bp]-Konstrukts (A-C). Bei dem [-216 bp]-Konstrukt zeigt sich dagegen, dass durch die Stimulation mit Ang II beziehungsweise mit Comp21 die Promotoraktivität gegenüber den jeweiligen Vehikelkontrollen verdoppelt wird (D).

4.5.8 Einfluss der AT2R-Aktivierung auf mRNA-Expression des PARP-1-Gens

In dem folgenden Versuch wurde der Einfluss einer AT2R-Aktivierung auf die PARP-1-mRNA-Expression in MEF-Zellen von PARP-1-WT-Tieren untersucht. Dafür wurden die folgenden Stimulationsbedingungen getestet: 0,1 μM Ang II, 0,1 μM Ang II + 10 μM Irb sowie 1 μM Comp21. Die mRNA-Expression des PARP-1-Gens wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf das entsprechende Vehikel standardisiert.

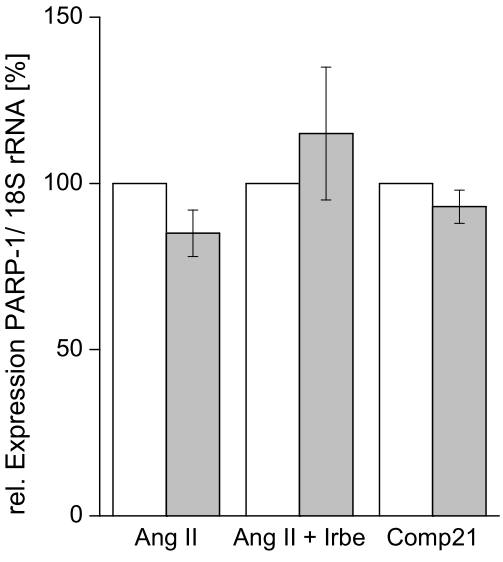


Abbildung 4.29: Endogene mRNA-Expression von PARP-1 in PARP-1-WT-Zellen unter AT2R-Aktivierung. MEFs wurden mit Ang II, Ang II + Irb sowie Comp21 (graue Säulen) beziehungsweise den enstprechenden Vehikelkontrollen (weiße Säulen) für 8 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von PARP-1 mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen 18S rRNA quantifiziert und auf das jeweilige Vehikel normalisiert.

In der Abbildung 4.29 ist das Transkriptionsniveau des PARP-1-Gens in MEF-Zellen von PARP-1-WT-Tieren nach der Aktivierung des AT2R über Agonisten dargestellt. Die PARP-1-mRNA-Expression zeigt unter dem Einfluss der drei getesteten Wirkstoffen keine signifikante Änderung gegenüber den Vehikelkontrollen.

4.5.9 Endogene mRNA-Expression des AT2R- und des ATBP50- Gens in PARP-1-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen

Die endogene mRNA-Expression des murinen AT2R- und ATBP50-Gens wurde im Herz, in der Niere und im Gehirn von sechs homozygoten PARP-1-*knockout*-Mäusen sowie in sechs

Wildtyp-Mäusen ermittelt. Die RNA wurde jeweils aus den gesamten Organen isoliert. Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen β-Aktin quantifiziert und jeweils auf den WT normalisiert.

Der *knockout* des PARP-1-Gens führt im Herzen der Tiere zu einer signifikanten Repression des Transkriptionsspiegels des AT2R-Gens. Er hat in diesem Organ jedoch keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des ATBP50-Gens (Abbildung 4.30 A und D). In den Nieren der PARP-1-*knockout*-Tiere ist die AT2R-mRNA-Expression im Vergleich zu den WT-Tieren ebenfalls deutlich geringer (B). Die mRNA-Expression des ATBP50-Gens in den Nieren der *knockout*-Tiere unterscheidet sich nicht von der Expression in den WT-Tieren (E). Im Gehirn resultiert der PARP-1-*knockout* dagegen in einer signifikanten Zunahme der murinen AT2R- und der ATBP50-mRNA-Expression (C und F).

4.5.10 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die PARP-1-Effekte

Neuronale KELLY-Zellen wurden mit den beiden AT2R-Konstrukten [-216-A bp] beziehungsweise [-216-G bp] für 24 Stunden transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für acht Stunden mit 30 mM 3-AB beziehungsweise Vehikel inkubiert und die Promotoraktivität ermittelt.

Die Stimulation der KELLY-Zellen mit 3-AB führt zu einer signifikanten Aktivierung der Promotoraktivität des [-216-G bp]- und des [-216-A bp]-Konstrukts und bestätigt damit die Ergebnisse, dass PARP-1 eine repressive Funktion auf den AT2R-Promotor ausübt (Abbildung 4.31). Die Regulation des AT2R-Promotors durch PARP-1 wird jedoch nicht durch den Polymorphismus beeinflusst, da kein signifikanter Unterschied in der Promotoraktivität des [-216-A bp]- und [-216-G bp]-Konstrukts unter der pharmakologischen Inhibierung von PARP registriert werden konnte.

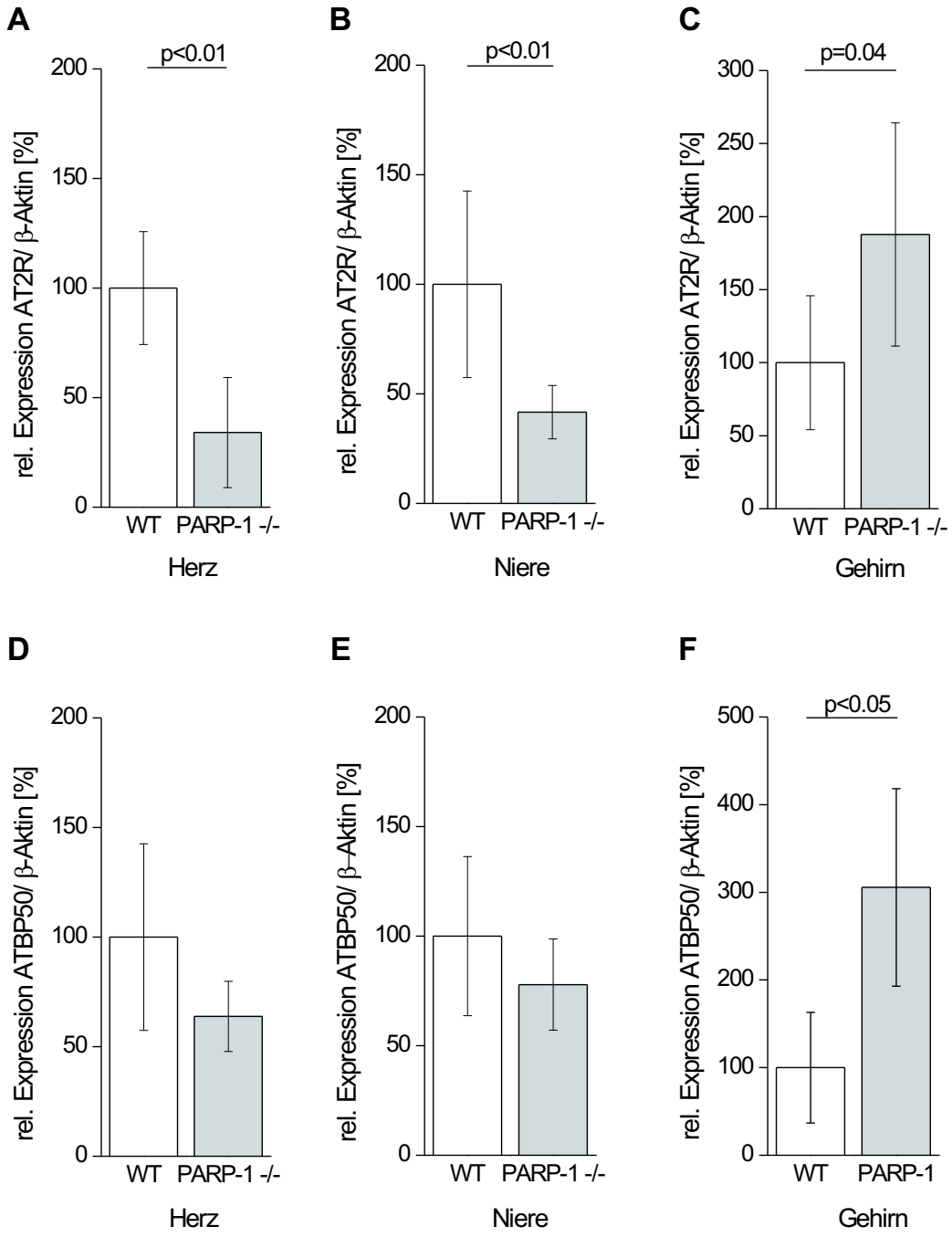


Abbildung 4.30: Endogene mRNA-Expression des AT2R- (A-C) und des ATBP50-Gens (D-F) in Herz, Niere und im Gehirn von PARP-1-*KO*- (graue Säulen) und WT-Mäusen (weiße Säulen). Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der *real-time*-PCR gegen das *housekeeping*-Gen β-Aktin quantifiziert und auf die Expression des WT normalisiert.

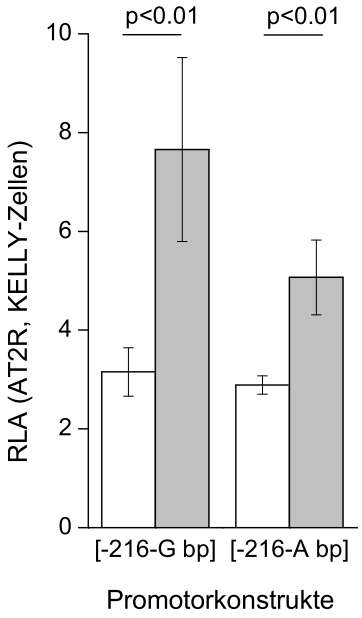


Abbildung 4.31: Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die PARP-1-vermittelten Effekte. Neuronale KELLY-Zellen wurden mit dem [-216-G bp]- und dem [-216-A bp]-Konstrukt für 24 Stunden transient transfiziert und anschließend für 8 Stunden mit 30 mM 3-AB (graue Säulen) respektive Kontrolle (weiße Säulen) behandelt. Die Promotoraktivität der beiden Konstrukte wurde über ein luzifersebasiertes Vektorsystem gemessen.

5 Diskussion

5.1 Expressionsanalyse des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens

Murine und humane Zelllinien wurden auf die endogene Expression des AT2R-Gens und des ATIP1- beziehungsweise ATBP50-Gens untersucht. Ziel war es ein Zellsystem zu etablieren, mit dem Regulationsmechanismen der Transkription beider Zielgene analysiert werden können. Die Expression des AT2R-Gens wurde zunächst mit Hilfe der qualitativen PCR und anschließender Gelelektrophorese ermittelt. Die Gelelektrophorese zeigte Produktbanden im zu erwartenden Molekülgewichtsbereich von 263 bp in Hela-S3-, MCF-7-, EA.hy926- und KELLY-Zellen. Gleichzeitig bestätigten die (RT-)-Kontrollen die Spezifität der Amplifikationsreaktionen. Für die Validierung dieser Ergebnisse wurden die putativ positiven AT2R-PCR-Produkte in den pGEM-T-*easy*-Vektor subkloniert und anschließend sequenziert. Die Auswertung der Sequenzierung mittels BLAST-Analyse führte zu dem Ergebnis, dass von den untersuchten humanen Zellen nur neuronale KELLY-Zellen unter den durchgeführten Zellkulturbedingungen das AT2R-Gen exprimieren. Die Genprodukte der identischen Fragmentgröße von 263 bp in Hela-S3-, MCF-7- und EA.hy926-Zellen waren nur zu 85% homolog zu der humanen AT2R-Gensequenz. Die BLAST-Analyse ergab zusätzlich, dass dieses Insert zu genomischen Sequenzen der Chromosomen 5 und 7 homolog ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei diesen teilkomplementären Abschnitten um Pseudogene des humanen AT2R handelt. Pseudogene sind Sequenzen, die im Genom einer Population präsent sind sowie große Ähnlichkeiten zu einem paralogen Gen aufweisen, jedoch in der Regel funktionell inaktiv sind. Die Pseudogensequenz entsteht zum Beispiel durch Retrotransposition oder durch das Duplizieren von DNA-Segmenten (Mighell et al. 2000; Römpler et al. 2007). Das Ergebnis der Versuchsreihe zeigte gleichzeitig die Wichtigkeit der Sequenzierung von PCR-Amplifikaten des schwach exprimierten AT2R-Gens. Die seltene AT2R-Genexpression in humanem Gewebe wurde ebenfalls von Warnecke et al. (2005) beschrieben, welche in keiner ihrer untersuchten Zelllinien funktionelle AT2R-Transkripte nachweisen konnten.

Die Analyse der endogenen AT2R-Expression in murinen Zellen hat gezeigt, dass von den untersuchten Zellen nur PC12W-Zellen das AT2R-Gen exprimieren. Die PC12W-Zellen wurden innerhalb der Passagen 9 bis 18 untersucht, da in dieser Phase das AT2R-Gen, aber nicht das AT1aR- beziehungsweise AT1bR-Gen exprimiert werden. Dieses Verhältnis kann sich bei höheren Passagen wieder ändern (Meffert et al. 1996).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden für die nachfolgenden Analysen endogener AT2R-Regulationen humane KELLY-Zellen ausgewählt. Humane MCF-7-Zellen wurden dagegen in Transfektionsexperimenten zur Untersuchung des AT2R-Promotors unter basalen Bedingungen eingesetzt, da dieser Zelltyp das AT2R-Gen nicht selbst endogen exprimiert und somit ein besser kontrollierbares Modellsystem darstellt.

Die Untersuchung der ATIP1-Expression zeigte, dass das humane ATIP1-Gen von endothelialen EA.hy926-Zellen sowie von den neuronalen Zelllinien SH-Sy5y und KELLY exprimiert wird. Das äquivalente murine ATBP50-Gen wird von allen untersuchten Zellen exprimiert. Dieses ubiquitäre Expressionsmuster könnte auf eine Funktion als *housekeeping*-Gen hindeuten. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden die weiteren Untersuchungen des ATIP1-Gens in endothelialen EA.hy926-Zellen durchgeführt.

Für die Studien des Einflusses von E2 auf die Transkription des humanen AT2R- und ATIP1-Gens sollten die verwendeten Zellsysteme zusätzlich mindestens einen der beiden Rezeptoren ERα oder ERβ endogen exprimieren, welche als Liganden-aktivierbare Transkriptionsfaktoren viele der biologischen Effekte von E2 vermitteln (Hall et al. 2001). Für diese Untersuchung wurde ein Primerdesign verwendet, das die universelle Detektion aller Isoformen des ERα- beziehungsweise des ERβ-Gens gewährleistet. Das humane ERα-Gen wird demzufolge von EA.hy926- und MCF-7-Zellen exprimiert, während das humane ERβ-Gen von EA.hy926-, MCF-7- sowie SH-Sy5y-Zellen transkribiert wird. Die Zelllinien wurden weiterhin auf die Expression des humanen TFF1-Gens überprüft. Es ist bekannt, dass die Transkription dieses Gens in MCF-7-Zellen durch die Stimulation mit E2 signifikant induziert wird (Metivier et al. 2003). Es kann somit als Positivkontrolle für die Östrogenstimulation fungieren. Von den untersuchten Zellen konnte in Hela-S3- und MCF-7-Zellen die TFF1-Transkription nachgewiesen werden. Die entsprechende Analyse der ER-Expression in den murinen Zelllinien ergab, dass H9c2- und PC12W-Zellen das ERα- und ERβ-Gen exprimieren. Die Untersuchung primärer kardialer Fibroblastenzellen aus weiblichen und männlichen Wistar-Ratten zeigte, dass die weiblichen Zellen nur das ERα-Gen exprimieren, die männlichen Zellen dagegen weder das ERα- noch das ERβ-Gen. Vergleichbare Untersuchungen von Watanabe et al. (2003) führten zu dem Ergebnis, dass in kardialen Fibroblastenzellen von neonatalen Wistar-Ratten das ERα-Gen sehr schwach und das ERβ-Gen stark exprimiert wird. Andere Arbeitsgruppen konnten zudem beide Rezeptoren auf Proteinebene detektieren (Mercier et al. 2003; Grohé et al. 1997; Xu et al. 2002).

Im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit sollte der Einfluss des Proteins PARP-1 auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression des PARP-1-Gens in neuronalen KELLY- und epithelialen EA.hy926-Zellen untersucht. In beiden Zelllinien konnte die PARP-1-Expression detektiert werden.

Aus diesen Voruntersuchungen ergaben sich folgende Zellsysteme für die transkriptionellen Untersuchungen des humanen AT2R- und ATIP1-Gens: Die Analyse des Östro-

geneinflusses auf das AT2R-Gen wurde in MCF-7-Zellen und auf das ATIP1-Gen in EA.hy-926-Zellen durchgeführt. Der PARP-1-Einfluss auf das AT2R-Gen wurde in neuronalen KELLY-Zellen untersucht. Für die entsprechende Analyse des ATIP1-Gen wurden endotheliale EA.hy926-Zellen verwendet.

5.2 Transkriptionsstartpunkte des humanen AT2R- und ATIP1-Gens

Die Ermittlung der transkriptionellen Startpunkte des humanen AT2R- und des ATIP1-Gens wurde mit Hilfe der RLM-5'-RACE durchgeführt. Diese Methode gewährleistet, dass nur vollständige 5'-Enden der cDNA in die Untersuchung eingehen und somit eine besonders präzise Bestimmung des Transkriptionsstartes möglich ist, da keine falsch-positiven Startpunkte aus beispielsweise degradierter mRNA generiert werden.

Die Expression des humanen AT2R-Gens ist im Vergleich zum ATIP1-Gen wesentlich geringer. Für die RLM-5'-RACE des AT2R-Gens wurde RNA aus gesundem humanem Gesamtherz verwendet, da dieses Gen im Herzen im Vergleich zu anderen Geweben stärker exprimiert wird (Schefe et al. (2006)). Das Ergebnis der RLM-5'-RACE zeigte für das humane AT2R-Gen einen transkriptionellen Startpunkt, der 1533 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt lokalisiert ist. In der anschließenden bioinformatischen Analyse der AT2R-Promotorstruktur konnte eine TATA-*box*-Region identifiziert werden, die sich 29 bp *upstream* von diesem Startpunkt befindet. Promotoren, die nur einen Transkriptionsstartpunkt aufweisen, besitzen häufig eine TATA-*box*, um die Bindung des Transkriptionsapparates zu erhöhen. Solche Promotoren sind hauptsächlich in die strenge Regulation gewebespezifischer Gene involviert (Müller et al. 2007).

Es sind bereits zwei transkriptionelle Startpunkte für das humane AT2R-Gen bekannt, die mit Hilfe der Primerextensionsanalyse identifiziert wurden (Warnecke et al. 1999). Sie befinden sich 34 bp und 10 bp *upstream* der TATA-*box*. Die Methode der Primerextensionsanalyse hat den Nachteil, dass auch cDNA mit unvollständigen 5'-Enden, zum Beispiel aus degradierten RNA-Transkripten, in die Analysen eingehen. Die RLM-RACE-Methode stellt eine Verbesserung gegenüber dieser Technik dar, da nur RNA-Transkripte mit einer vollständigen 5'-Cap Struktur bei der Startpunktbestimmung analysiert werden (Schaefer 1995). Die von Warnecke et al. (1999) ermittelten Transkriptionsstartpunkte befinden sich *upstream* der TATA-*box*. Im Allgemeinen ist die TATA-*box* jedoch 25 bp bis 30 bp *upstream* des Trankriptionsstartpunkts lokalisiert (Thomas and Chiang 2006; Smale and Kadonaga 2003). Das Protein TBP erkennt die TATA-*box* und leitet somit den initialen Schritt bei der Rekrutierung des PICs ein (Smale and Kadonaga 2003). Demzufolge ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei den von Warnecke et al. identifizierten Startpunkten um die tatsächlichen Transkriptionsstartpunkte des AT2R-Gens handelt.

Für die Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte des humanen ATIP1-Gens wurde RNA aus neuronalen SH-Sy5Y-Zellen verwendet. Die Untersuchung führte zu der Iden-

tifizierung von zwei transkriptionellen Startpunkten, die sich 293 bp und 304 bp *upstream* vom Translationsstart befinden. Die anschließende bioinformatische Promotoranalyse hat gezeigt, dass das ATIP1-Gen keine TATA-*box* besitzt.

Die RLM-5'-RACE ist gleichzeitig ein sensitiver Indikator für die Expressionsstärke eines Gens. Bei der Identifizierung der transkriptionellen Startpunkte des humanen ATIP1-Gens besaßen alle sequenzierten Klone das korrekte RACE-PCR-Produkt und weisen auf ein hohes Transkriptionsniveau hin. Im Vergleich hierzu wurde bei der Ermittlung des AT2R-Transkriptionsstartpunkts nur in etwa einem von 70 Klonen die korrekte AT2R-Sequenz detektiert. Dieses Resultat bestätigt die geringe endogene Expression des AT2R-Gens.

5.3 Identifizierung regulativer Elemente im humanen AT2R- und ATIP1-Promotor

Für die Analysen des humanen AT2R-Promotors unter basalen Bedingungen wurden epitheliale MCF-7-Zellen mit unterschiedlich großen AT2R-Konstrukten transient transfiziert. Diese Zellen exprimieren das AT2R-Gen nicht endogen und gewährleisten daher kontrollierte Untersuchungsbedingungen. Die Promotoranalyse unter basalen Bedingungen zeigte, dass das AT2R-Gen einen schwachen Promotor besitzt. Die relative Aktivität des AT2R-Promotors ist etwa zwanzigfach schwächer als diejenige eines *housekeeping*-Promotors wie beispielsweise des Ece-1c-Gens (Funke-Kaiser et al. 2000).

Aus der Versuchsreihe geht hervor, dass die Erweiterung des AT2R-Promotorbereichs von [-916 bp] auf [-1116 bp] in einer Abnahme der Aktivität um 50% resultierte. Dieses Verhalten weist auf eine *silencer*-Region im [-1116 bp]-Konstrukt hin. *Silencer* fungieren als Kontrollelemente der Transkription, in dem sie im Zusammenspiel mit Transkriptionsfaktoren die Promotoraktivität eines Gens herabsetzen (Kornberg 2007). Die verwendeten Konstrukte [-316 bp], [-516 bp], [-716 bp], [-916 bp], [-1116 bp] und [-1316 bp] besitzen in ihren Promotorbereichen das Intron 1 und das Exon 1 sowie unterschiedlich große *upstream*-Bereiche. Konstrukte, die das Intron 1 und das Exon 1 in ihrer Promotorsequenz nicht enthalten, wie zum Beispiel das [-1100 bp]-Konstrukt, weisen nur eine sehr schwache Promotoraktivität auf, obwohl sie den Transkriptionsstartpunkt im 5'-*upstream*-Bereich enthalten. Warnecke et al. (1999) haben bereits auf die Wichtigkeit des Intron 1 im AT2R-Promotor hingewiesen. Sie führten die Zunahme der Promotoraktivität auf ein 12 bp großes *enhancer*-Element in diesem Bereich zurück, da Mutationen dieser Region in einer signifikanten Abnahme der Aktivität resultierten. Die Ergebnisse der Zelltransfektion mit den [-216 bp]- und [-148 bp]-Konstrukten bestätigen die entscheidene regulative Funktion dieses Promotorbereichs: Die Promotoraktivität des [-216 bp]-Konstrukts ist identisch zu der Aktivität des [-1316 bp]-Konstrukts, obwohl letzteres zusätzlich über den größten 5'-*upstream*-Bereich inklusive des Transkriptionsstartpunkts verfügt. Auch die Promotoraktivität des [-148 bp]-Konstrukts liegt noch deutlich über derjenigen des [-1100 bp]-Konstrukts. Die Wiederholung des Versuches in neuronalen KELLY-Zellen, welche das AT2R-Gen endogen exprimieren, verifizierte dieses Ergebnis.

Das Promotorverhalten des ATIP1-Gens ist bisher unbekannt. Aufgrund der Funktion von ATIP1 als zytoplasmatischer Interaktionspartner des AT2R wurde der ATIP1-Promotor ebenfalls unter basalen Bedingungen untersucht. Dafür wurden humane EA.hy-926- und MCF-7-Zellen mit ATIP1-Promotorkonstrukten unterschiedlicher Größe transient transfiziert. Der monotone Anstieg der Promotoraktivität der Konstrukte bis [-700 bp] lässt darauf schließen, dass die Promotoraktivität von der Bindung des Transkriptionsapparats an die transkriptionellen Startpunkte im [-300 bp]- und [-500 bp]-Bereich dominiert wird. Die Abnahme der Aktivität bei Erweiterung des Promotorbereichs auf [-900 bp] beziehungsweise [-1100 bp] ist ein Indiz für ein *silencer*-Element in dieser Region. Das Promotorverhalten ist in beiden untersuchten Zelltypen qualitativ konsistent und zeigt somit keine Abhängigkeit von der endogenen Expression des Gens.

5.3.1 Charakterisierung des regulativen *cis*-Elements in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens

Die Promotoranalyse des humanen AT2R-Gens unter basalen Bedingungen weist auf die wichtige Rolle der Exon-1-/Intron-1-Region für die Aktivität des AT2R-Promotors hin. Grundsätzlich kann es sich hierbei um das von Warnecke et al. (1999) vermutete *enhancer*-Element oder um einen weiteren transkriptionellen Startpunkt handeln. Da *enhancer*-Elemente unabhängig von ihrer Orientierung innerhalb des Promotors wirken, Transkriptionsstartpunkte jedoch orientierungsabhängig sind (Smale and Kadonaga 2003), wurde ein inverses [-216 bp]-Konstrukt generiert. Das Ergebnis der Zelltransfektion mit dem *sense* und dem inversen [-216 bp]-Konstrukt zeigte, dass die Orientierung dieser Region einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des AT2R-Promotors hat. Die Promotoraktivität nimmt bei inverser Orientierung im Vergleich zu der *sense*-Orientierung um 80% ab.

Dieses Resultat weist darauf hin, dass es sich bei dem regulativen Element nicht um den vermuteten *enhancer*, sondern um einen weiteren transkriptionellen Startpunkt handelt. Die Sequenzanalyse zeigte, dass sich im Intron 1 ein Motiv befindet, das mit der Inr-Konsensussequenz verwandt ist (Warnecke et al. 1999). Im Vergleich zu der exakten Inr-Sequenz 5'-PyPyAN(T/A)PyPy-3' (Thomas and Chiang 2006) fehlt dem Motiv im Intron 1 5'-TCTGTTTT-3' jedoch das Nukleotid Adenin an der Position 3, bei dem es sich bei den meisten Genen um den eigentlichen Startpunkt handelt, welcher die RNA-Polymerase II am transkriptionellen Startpunkt positioniert. Eine aktive Funktion dieser Sequenz als transkriptioneller Startpunkt ist demnach unwahrscheinlich.

5.3.2 Verifizierung des alternativen Transkriptionsstartpunkts in der Exon-1-/Intron-1-Region des humanen AT2R-Gens

Aufgrund der Hinweise auf einen weiteren transkriptionellen Startpunkt innerhalb des [-216 bp]-Konstrukts wurde erneut eine RLM-5'-RACE durchgeführt. In diesem Fall wurden die EA.hy926-Zellen mit dem [-216 bp]-Konstrukt transfiziert, so dass die Transkriptions-

wirkung des Exon-1-/Intron-1-Bereichs hinsichtlich eines transkriptionellen Startpunkts isoliert betrachtet werden konnte.

Diese Untersuchungen zeigten, dass Regionen innerhalb des Exon-1-/Intron-1-Bereichs einen transkriptionellen Startpunkt generieren, der sich 62 bp *upstream* vom Exon 1 befindet. Da sich die Exon-1-/Intron-1-Region als notwendig für die Aktivität des AT2R-Promotors erwiesen hat, ohne demzufolge selbst einen Startpunkt zu enthalten, lässt sich folgern, dass dieser Bereich für die Rekrutierung des Transkriptionsapparates essentiell ist. Wahrscheinlich liegt ein Mechanismus zugrunde, bei dem die Rekrutierung der TFs einen räumlichen Überhang des Transkriptionsapparates generiert und hierdurch die RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart 62 bp *upstream* vom Exon 1 positioniert.

Ein weiterer Hinweis zur Stützung dieser Hypothese ist, dass mit Hilfe der bioinformatischen Analyse des Exon 1 ein DCE-S_{III}-Element in dieser Region identifiziert werden konnte. Das DCE-S_{III}-Element gehört zu den Kernpromotorelementen von RNA-Polymerase II transkribierten Promotoren (Thomas and Chiang 2006). Dieses Element interagiert spezifisch mit dem Protein TAF1, welches dem Multiproteinkomplex TFIID angehört. Die DCE-S_{III}-Konsensussequenz AGC befindet sich im Exon 1 an der Position +31 bp *downstream* vom Transkriptionsstartpunkt und liegt damit im definierten Bereich von +30 bp bis +34 bp (Thomas and Chiang 2006). Da die Untereinheit S_{III} des DCE-Elements unabhängig von den anderen beiden Untereinheiten S_I und S_{II} die TAF1-Bindung vermitteln kann (Lee et al. 2005), ist denkbar, dass die transkriptionelle Regulation des humanen AT2R-Gens auch über dieses Element erfolgt.

Die Transfektion der Zellen mit dem vollständigen [-1316 bp]-Promotorkonstrukt wurde als Kontrolle mitgeführt. Mit Hilfe dieser Kontrolle konnte sowohl der in humanem Herzen identifizierte Startpunkt als auch der alternative Startpunkt verifiziert werden.

5.3.3 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf den humanen AT2R-Promotor

Der Polymorphismus -G1332A ist im Intron 1 lokalisiert und weist eine Allelfrequenz von G=0,51/A=0,49 auf (Erdmann et al. 2000). Das A-Allel ist bei Männern mit linksventrikulärer Hypertrophie und bei Frauen mit koronarer Ischämie assoziiert (Warnecke et al. 2005). Aus diesem Grund wurde der Einfluss dieses SNPs auf die Promotoraktivität des AT2R-Gens unter basalen Bedingungen untersucht. Die Analysen zeigten, dass das Promotorkonstrukt mit dem G-Allel eine signifikant stärkere Aktivität im Vergleich zum Konstrukt mit dem A-Allel aufweist. Dieser Aktivitätsunterschied könnte daher die Ursache für die mit dem A-Allel assoziierten Krankheitsbilder aufgrund eines Ungleichgewichts in der AT2R-Expression sein.

5.4 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens durch Östrogene

Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Östrogene auf die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen einen Einfluss ausüben (Regitz-Zagrosek 2006). Der kardioprotektive Effekt von Östrogenen in prä-menopausalen Frauen wird unter anderem mit der Inhibierung der AT1R-Expression und einer Aktivierung der AT2R-Expression im Myokardium in Zusammenhang gebracht (Regitz-Zagrosek et al. 2004). Vor diesem Hintergrund sollte innerhalb der folgenden Studien der Mechanismus der transkriptionellen Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens genauer charakterisiert werden.

5.4.1 Bioinformatische Analyse des humanen AT2R- und ATIP1-Promotors

Östrogenresponsive Elemente (EREs) spielen in der ligandenabhängigen Signalübertragung durch das Hormon E2 eine zentrale Rolle. Die Bindung dieses Hormons an die Rezeptoren ERα und ERβ löst eine Konformationsänderung der Rezeptoren aus, wodurch sie von einem inaktiven in einen transkriptionell aktiven Zustand wechseln (Kong et al. 2003). In diesem Zustand können die Rezeptoren über EREs mit der DNA interagieren. Aus diesem Grund wurden zu Beginn dieser Untersuchungsreihe die Promotoren des humanen AT2R- und ATIP1-Gens auf die Präsenz von EREs untersucht. Für das AT2R-Gen konnte dabei ein halbseitiges steroidresponsives Element im Intron 1 ermittelt werden. Ein solches Motiv ist für die Interaktion der Östrogenrezeptoren mit der DNA sowie die Signalübertragung von E2 ausreichend (Welboren et al. 2007). Eine molekularbiologische Basis für den transkriptionellen Einfluss des Hormons auf das AT2R-Gen ist demnach gegeben. Dagegen lieferte die bioinformatische Analyse keinen Anhaltspunkt für einen ligandenabhängigen Effekt von E2 auf die ATIP1-Transkription, da diesem Gen ein entsprechendes DNA-responsives Element im Promotor fehlt. Die Referenzanalyse des östrogenresponsiven TFF1-Gens bestätigte ein palindromisches ERE im Promotorbereich.

5.4.2 Einfluss von E2 auf die transkriptionelle Regulation des TFF1-Gens

Das humane TFF1-Gen ist ein bekanntes *downstream*-Zielgen der ligandenabhängigen Signalkaskade von Östrogenen und wird daher in der Molekularbiologie häufig als genetisches Modell für Studien der E2-Wirkung auf die transkriptionelle Regulation implementiert (Métivier et al. 2004; Ju and Rosenfeld 2006). Innerhalb dieser Arbeit wurde TFF1 als Positivkontrolle für Östrogenstimulationsversuche verwendet. Zu diesem Zweck wurde zunächst die E2-Wirkung auf die transkriptionelle Regulation des TFF1-Gens auf mRNA-, Promotor- und Chromatinebene genauer charakterisiert. Für die Untersuchung wurden MCF-7-Zellen vor der Stimulation für 72 Stunden in steroid- und phenolrotfreiem Medium kultiviert, da das Phenolrot des Vorkulturmediums sonst mit E2 um die Bindungsstellen der Östrogenrezeptoren konkurrieren kann (Tsang et al. 2001). In der anschließenden

Stimulation wurde eine E2-Konzentration von 10 nM gewählt. Diese entspricht einer Massenkonzentration von 2,72 ng/ml und liegt damit in dem Bereich der humanen endogenen Östrogenkonzentration im Plasma (Turner and Wass 2002).

5.4.2.1 Einfluss von E2 auf die mRNA-Expression des TFF1-Gens

Die Untersuchungsergebnisse zeigten einen oszillierenden Verlauf der TFF1-mRNA-Expression nach der einmaligen Zellstimulation mit E2 (Abbildung 4.11). Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde eine alternierende Folge von transkriptionell produktiven Zyklen und unproduktiven Phasen beobachtet. Ein ähnlicher Transkriptionsverlauf wurde von Metivier et al. (2003) beschrieben. Diese Gruppe interpretierte dieses zyklische Verhalten als eine transkriptionelle Uhr, die der Synchronisation der Transkriptionsaktivität über einen längeren Zeitraum dient. Der physiologische Nutzen solcher schwingenden Promotoren liegt dabei wahrscheinlich in einer engen Regulation der Genexpression, indem über diesen längeren Zeitraum aktive Phasen von *clearance*-Phasen unterbrochen werden, aus denen die Zelle schnell wieder in den inaktiven Zustand überführt werden kann (Perissi and Rosenfeld 2005). Die charakteristische Frequenz oszillierender Transkriptionsprozesse kann darüber hinaus einen spezifischen Informationsschlüssel zur Übertragung von Signalen darstellen, um *crosstalks* zwischen Signaltransduktionswegen zu vermeiden (Perissi and Rosenfeld 2005).

5.4.2.2 Einfluss von E2 auf den TFF1-Promotor

Die Untersuchung des E2-Einflusses auf das Promotorverhalten des TFF1-Gens führte zu dem Ergebnis, dass das Hormon E2 einen reprimierenden Effekt auf die TFF1-Promotoraktivität ausübt. Gleichzeitig zeigte die E2-Stimulation jedoch auf der mRNA-Ebene eine induzierende Wirkung auf die endogene TFF1-mRNA-Expression. Dieses Ergebnis stellt einen Widerspruch zum publizierten Stand der Forschung dar, in dem von einer Aktivierung der TFF1-Promotoraktivität unter dem Einfluss von E2 ausgegangen wird.

Vor diesem Hintergrund wurden weitere Versuche durchgeführt, um zu verifizieren, dass es sich bei den Beobachtungen um Artefakte oder einen systematischen Zusammenhang handelt. Zunächst wurde untersucht, ob das Lösungsmittel Ethanol bereits einen Effekt auf die Transkription des TFF1-Gens ausübt. Die Endkonzentration von Ethanol beträgt bei der Zellstimulation 10 nM und entpricht weniger als 0,003‰. Um einen Lösungsmitteleffekt auf das Promotorverhalten des TFF1-Gens auszuschließen, wurden identische Versuche unter der Verwendung von ethanol- und wasserlöslichem E2 durchgeführt sowie Vehikelkontrollen parallel mitgeführt. Die Zellstimulation mit ethanol- und wassergelöstem E2 resultierte in der gleichen signifikanten Reduktion der TFF1-Promotoraktivität gegenüber den Vehikelkontrollen. Gleichzeitig führte das wasserlösliche E2 ebenso wie zuvor das ethanollösliche E2 zu einer signifikanten Zunahme der endogenen TFF1-mRNA-Expression. Ein Einfluss von Ethanol auf das TFF1-Promotorverhalten konnte somit ausgeschlossen werden.

Die Stimulation des ERα durch E2 induziert die Rekrutierung von Koaktivatorkomplexen, die bei der Histonacetylierung, Methylierung, bei Chromatin-Remodellingprozessen sowie der Initiation der PIC-Rekrutierung eine wichtige Rolle spielen (Metivier et al. 2003). Für eine Verstärkung von E2-Effekten wird bei *in vitro*-Untersuchungen daher häufig das ERα-Gen kontransfiziert (Zhao et al. 2002). Unter Verwendung einer stabil transfizierten MCF-7-Zelllinie mit dem ERα-Gen konnten Sun et al. (2005) eine Aktivierung der TFF1-Promotoraktivität unter der Stimulation mit E2 beobachten. Um einen vergleichbaren Zusammenhang zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss eines kotransfizierten ERα–Expressionsvektors unter der Behandlung der Zellen mit E2 auf die TFF1-Promotoraktivität ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Kotransfektion des ERα-Gens im Vergleich zur Kontransfektion des entsprechenden Leervektors unter E2-Stimulation zu einer Aktivierung der TFF1-Promotoraktivität führt. Diese Änderung der Promtorstärke war jedoch gegenüber der Vehikelkontrolle nicht signifikant, woraus sich schließen lässt, dass der Anstieg der TFF1-Promotoraktivität durch die Kotransfektion allein und nicht durch die E2-Stimulation vermittelt wird.

Mit Hife der Kontrollversuche konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Kotransfektion des ERα-Expressionsvektors unter der Stimulation mit E2 bereits einen deutlich aktivierenden Effekt auf den Promotor des pGL3-*basic*-Vektors ausübt. Die Aktivierung der TFF1-Promotoraktivität bei Kotransfektion des ERα-Gens und gleichzeitiger E2-Stimulation lässt sich daher zusätzlich auf einen Einfluss auf die pGL3-*basic-backbone*-Struktur zurückführen. Die Durchführung dieser Kontrollversuche verifiziert demzufolge die reprimierende Wirkung von E2 auf die TFF1-Promotoraktivität.

Die oben diskutierten Transfektionsversuche wurden mit einem 568 bp großen TFF1-Promotorkonstrukt durchgeführt. Die kontroverse E2-Wirkung auf die TFF1-mRNA-Expression und die TFF1-Promotoraktivität ließe sich mit der unterschiedlichen Promotorgröße in beiden Systemen erklären, da auf die endogene mRNA-Expression der vollständige Promotor mit seinen regulativen Elementen wirkt. Für einen weiteren Kontrollversuch wurde daher der Einfluss von E2 auf ein 1300 bp großes TFF1-Promotorkonstrukt untersucht, das im Vergleich zum [-568 bp]-Konstrukt zusätzliche Promotorelemente aufweist. Die Transfektion von MCF-7-Zellen mit den beiden Promotorkonstrukten [-568 bp] und [-1300 bp] zeigte unter E2-Stimulation jedoch die gleiche signifikante Reduktion der TFF1-Promotoraktivität im Vergleich zum Vehikel und bestätigte gleichzeitig die deutliche Zunahme der endogenen TFF1-mRNA-Expression in parallel mitgeführten Expressionsanalysen.

5.4.2.3 Einfluss von E2 auf die Regulation des TFF1-Gens innerhalb des Chromatinkontexts

Ein wichtiger Modulator des Genexpressionslevels ist der Chromatinkontext (Yan and Boyd 2006). Die enzymatische Modifikation von Histonen steuert die Kondensationsdichte eines Gens und übt darüber einen großen Einfluss auf dessen transkriptionelle Aktivierung oder

Reprimierung aus. Es ist unter anderem dieses Zusammenspiel von Chromatinstruktur und Transkriptionsfaktoren, welches das Transkriptionsniveau der Gene reguliert. Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Zellstimulation mit E2 zu einer verstärkten Rekrutierung der RNA-Polymerase II am Promotor des TFF1-Gens im Chromatinkontext führt. Dabei wurde deutlich, dass die Stimulation mit E2 in einer dreißigfach stärkeren Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor dieses Gens resultiert.

Es ist bekannt, dass die transkriptionelle Induktion verschiedener Steroidrezeptoren mittelbar über die verstärkte Rekrutierung von chromatinmodifizierenden Enzymen zur Steigerung der Transkriptionsrate führt (Oduro et al. 2008). Mit Hilfe des ChIP-Experiments konnte hier ebenfalls für das TFF1-Gen eine Zunahme der Rekrutierung von der RNA-Polymerase II im Chromatinkontext bestätigt werden. Die Schlussfolgerung aus den Versuchen zur E2-Regulation des TFF1-Gens ist, dass die reprimierende Wirkung von E2 auf den TFF1-Promotor im Transfektionssystem als indirekte Positivkontrolle für die E2-Aktivität implementiert werden kann. Dieses Verhalten spiegelt jedoch nicht die Regulation auf der mRNA-Ebene wider.

5.4.3 Einfluss von E2 auf den AT2R- und ATIP1-Promotor

Trotz verschiedener Hinweise auf eine positive Regulation des AT2R durch E2 sind die genauen regulativen Mechanismen bisher unbekannt. Zur Klärung dieser Zusammenhänge wurde in dieser Versuchsreihe der Einfluss von E2 auf das Promotorverhalten des humanen AT2R-Gens und seines Interaktionspartners, das ATIP1, untersucht. Die bioinformatische Voruntersuchung hatte gezeigt, dass im Intron 1 des humanen AT2R-Gens ein halbseitiges steroidresponsives Element lokalisiert ist. Über dieses Element kann E2 prinzipiell seine Wirkung auf den AT2R-Promotor vermitteln. Tatsächlich zeigten die Transfektionsversuche, dass die Stimulation mit E2 mit einer geringen, aber signifikanten Zunahme der Promotoraktivität des [-148 bp]- und [-216 bp]-Konstrukts korreliert. Bei der Deletionsmutante [-1316 bp], die den größten Promotorbereich der untersuchten AT2R-Genkonstrukte aufweist, ist dieser Effekt jedoch wieder nivelliert. Eine endogene Wirkung von E2 auf den humanen AT2R-Promotor ist daher unwahrscheinlich.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass E2 keine bedeutenden Effekte auf den ATIP1-Promotor ausübt. Die Promotoraktivität des [-500 bp]-Konstrukts nimmt zwar unter der Stimulation mit E2 leicht ab, auf das [-1100 bp]-Konstrukt hat E2 jedoch keinen Einfluss. Dies ist in Übereinstimmung mit der bioinformatischen Voruntersuchung des ATIP1-Promotors. Diese hatte gezeigt, dass der ATIP1-Promotor in seiner Sequenz weder über ein ERE, noch über ein steroidresponsives Element verfügt und folglich nicht direkt durch E2 induzierbar ist.

5.4.4 Transkription des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens in gesunden Herzen

Eine geringere Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei prä-menopausalen Frauen wird mit einer verstärkten AT2R-Expression im Myokardium und in der Niere in Zusammenhang gebracht (Regitz-Zagrosek 2006). In der folgenden Versuchsreihe wurde erstmals die mRNA-Expression des AT2R- und ATBP50-/ATIP1-Gens in gesunden Herzen geschlechtsspezifisch in Wistar-Ratten und im Menschen ermittelt.

Das AT2R- und ATBP50-Gen wird von Zellen des Vorhofs und der Herzkammer weiblicher und männlicher Tiere exprimiert (siehe Kapitel 4.4.4.1). Der Versuch zeigte, dass diese Expression in keinem der beiden Gewebe geschlechtsspezifisch reguliert stattfindet. Vergleichbare Literaturdaten für die Niere weisen darauf hin, dass die AT2R-Expression in den Nieren von erwachsenen männlichen Ratten überhaupt nicht, nur in sehr geringen Expressionsraten oder lediglich in Blutgefäßen, in tubulären Strukturen sowie in den Glomeruli exprimiert wird (Saavedra et al. 2001; Ozono et al. 1997; Armando et al. 2002). Dagegen wird in den Nieren weiblicher Tiere eine stärkere AT2R-Expression gefunden, die auf einen höheren endogenen E2-Spiegel zurückgeführt wird.

Der Unterschied in der AT2R-Expression zwischen der Niere und dem Herzen deutet auf eine gewebespezifische Regulation des AT2R-Gens hin. Die Untersuchungen zeigten außerdem eine stärkere mRNA-Expression des ATBP50-Gens in der Herzkammer im Vergleich zum Vorhof. Die ATBP50-mRNA-Expression wird nicht geschlechtsspezifisch reguliert.

Die entsprechenden Untersuchungen in humanem Herzgewebe haben ebenfalls keine geschlechtsspezifische Regulation der AT2R- und ATIP1-Gene in der Probandengruppe gesunder Männer und Frauen ergeben, weder in der Altersgruppe unter 40 Jahren noch in der Altersgruppe 50 bis 65 Jahre. Die Herzgewebeproben stammten von Spendern, die keine Anzeichen einer Herzerkrankung zeigten. Die Abnahme des Östrogenspiegels bei gesunden post-menopausalen Frauen hat folglich keinen Einfluss auf die endogene AT2R-Expression. Dieses Ergebnis widerlegt die Hypothese, dass E2 im Herzen zu einer verstärkten AT2R-Expression führt und dadurch eine kardiovaskuläre Protektion in prä-menopausalen Frauen vermittelt (Regitz-Zagrosek 2006). Die Analysen haben jedoch große individuelle Unterschiede in der Expression der beiden Gene im Herzen gezeigt. Dieses Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Biopsien aus unterschiedlichen Kompartimenten der Herzen stammten. Gleichzeitig konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Expression beider Gene ermittelt werden.

5.4.5 Transkription des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens in pathologischen Herzen

Die endogene Expression des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens im pathologisch auffälligen Herzen wurde in Wistar-Ratten nach der Induktion eines Herzinfarktes untersucht.

Ein Teil der Tiere wurde anschließend mit dem AT2R-Agonisten Comp21 behandelt (Kaschina et al. 2008). Für die Untersuchungen im humanen System wurde die Expression der beiden Gene in Herzgewebeproben von Patienten mit einer Herzinsuffizienz analysiert.

Die murine mRNA-Expression des AT2R-Gens steigt demnach nach der Induktion eines Herzinfarktes im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant an. Dieses Verhalten ist bereits in der Literatur beschrieben (Volpe et al. 2003; Gallinat et al. 1998). Die Ergebnisse der Versuchsreihe zeigten, dass die Behandlung der Tiere mit dem AT2R-Agonisten Comp21 nach der Induktion eines Herzinfarktes in einer signifikanten Reprimierung der AT2R-mRNA Expression resultiert. Diese ist wieder auf dem Niveau von den Kontrolltieren. Kaschina et al. (2008) haben erstmals die Wirkung des AT2R-Agonisten Comp21 untersucht und konnten zeigen, dass die Behandlung mit Comp21 die systolische sowie die diastolische ventrikuläre Funktion von Wistar-Ratten mit einem Myokardinfarkt verbessert. Dabei wird durch die Behandlung der Tiere mit einem AT2R-Agonisten die AT2R-Aktivität mutmaßlich erhöht, während die hier durchgeführten Versuche gleichzeitg eine Verringerung der AT2R-mRNA-Expression durch Comp21 zeigten (Abbildung 4.19). Dieses Resultat bedeutet, dass der Effekt von Comp21 nicht der einfachen AT2R-Transkriptionssteuerung zugeschrieben werden kann. Vielmehr deutet das Ergebnis auf eine *feedback*-Hemmung aus der AT2R-Kaskade nach dessen Stimulation hin. Eine gute oder schädliche Rolle des AT2R kann somit nicht auf Transkriptionsebene allein entschlüsselt werden, sondern erfordert eine weitere Analyse der *downstream*-Targets.

Das AT2R-Gen interagiert im C-Terminus mit zwei unterschiedlichen Interaktionspartnern, dem ATIP1-/ATBP50-Protein beziehungsweise dem Protein PLZF. Die Bindung des ATIP1-/ATBP50-Proteins resultiert in einer Translokation des AT2R vom Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Durch diese Interaktion werden die antiproliferativen sowie die ERK1/2-inhibierenden Effekte des AT2R vemittelt (Wruck et al. 2005; Nouet et al. 2004). Der hier durchgeführte Versuch zeigte, dass die Induktion eines Myokardinfarktes in den Tieren zu einer Reduktion der ATBP50 mRNA-Expression führt (Abbildung 4.19). Die Behandlung der Tiere mit Comp21 resultierte in einer tendenziell verstärkten, jedoch nicht signifikanten Induktion der ATBP50-mRNA-Expression.

Die Untersuchung der beiden Zielgene in humanen pathologischen Herzen zeigte einen signifikanten Anstieg der AT2R-mRNA im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Dieses Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse aus den vorherigen Tierversuchen und ist in Übereinstimmung mit der Literatur (Volpe et al. 2003; Gallinat et al. 1998). Eine geschlechtsspezifische Regulation konnte nicht beobachtet werden. Die mRNA-Expression des ATIP1-Gens ist in den männlichen und weiblichen pathologischen Biopsien im Vergleich zur Kontrolle signifikant reprimiert. Im Gegensatz zum AT2R-Gen wurde für das ATIP1-Gen ein geschlechtsspezifischer Unterschied des Transkriptionsniveaus im pathologischen System gemessen, wobei das Gen in den Proben kranker Männer signifikant stärker reprimiert ist als in den Proben kranker Frauen.

Diese Ergebnisse widerlegen die Arbeitshypothese, dass die Expression des humanen AT2R-Gens geschlechtsspezifisch reguliert ist. Eine geschlechtsspezifische Tendenz wurde jedoch für die ATIP1-Expression beobachtet. Sowohl die humanen Daten als auch die Tierdaten lassen vielmehr auf eine gegensätzliche Regulation der beiden Gene schließen. Aufgrund ihrer Interaktion auf Proteinebene wäre eine Abhängigkeit dieser Regulation plausibel, da ATIP1-/ATBP50 die Translokation des AT2R aus dem Golgi an die Zelloberfläche bewirkt. Die Abnahme des ATIP1/ATBP50-Transkriptionsspiegels könnte zu einer verminderten Translokation des AT2R an die Zelloberfläche führen, was durch eine erhöhte AT2R-Transkriptionsrate kompensiert werden könnte. Diese Zusammenhänge müssten jedoch auf Proteinebene verifiziert werden.

5.5 Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP-1/ATBP50-Gens durch PARP-1

Aktuelle Forschungsergebnisse identifizierten PARP-1 als transkriptionellen Regulator verschiedener Gene (Kraus 2008). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass PARP-1 in die Pathogenese des arteriellen Bluthochdrucks sowie seiner Folgeerkrankungen involviert ist (Pillai et al. 2006). Die verantwortlichen regulativen Mechanismen zwischen dem RAS und PARP-1 sind bisher jedoch unbekannt. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss der Polymerase PARP-1 auf die Transkription des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens als Komponenten der RAS-Kaskade analysiert.

Die hier durchgeführten Untersuchungen der PARP-1 vermittelten Effekte auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens führten zu dem Ergebnis, dass PARP-1 ein transkriptioneller Modulator der beiden Zielgene ist und somit ein neues verbindendes Element innerhalb der RAS-Kaskade darstellt. Innerhalb der AT2R-Transkription fungiert das Enzym PARP-1 als Repressor während es bei der Transkription des ATIP1-/ATBP50-Gens als Aktivator wirkt.

In der Literatur sind zwei Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch PARP-1 beschrieben: es kann entweder die Chromatinstruktur modulieren oder als Komponente eines *enhancer*- oder promotorbindenden Komplexes in Verbindung mit anderen DNA-bindenden Faktoren und Koaktivatoren agieren (D'Amore et al. 2005; Kraus and Lis 2003). Innerhalb eines solchen Komplexes kann PARP-1 die Transkription als Aktivator oder Repressor beeinflussen, abhängig vom Zelltyp und Promotorkontext (D'Amore et al. 2005).

Die pharmakologisch relevante Inhibierung von PARP mit 3-AB resultierte in einer signifikanten Zunahme des Transkriptionsniveaus des AT2R-Gens in neuronalen KELLY-Zellen sowie in der Repression der mRNA-Expression des humanen ATIP1-Gens in EA.hy-926-Zellen. PARP-1 kann duale Effekte auf Promotoren ausüben. Durch die Inhibierung der PARP-1-Enzymaktivität kann beispielsweise die Expression eines Gens reprimiert werden, während ein *knockdown* beziehungsweise *knockout* des PARP-1-Gens bei demselben

Zielgen die gegenteilige Wirkung vermittelt (Amiri et al. 2006; Soldatenkov et al. 2002). Um diesen Mechanismus für die AT2R- und ATIP1-Modulation zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression beider Zielgene in MEFs von homozygoten PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen analysiert. Es zeigte sich, dass der *knockout* des PARP-1-Gens in einer signifikanten Zunahme des murinen AT2R-Transkriptionsspiegels sowie in der Reprimierung der mRNA-Expression des murinen ATBP50-Gens resultiert. Folglich haben sowohl die enzymatische als auch die genetische Inhibierung von PARP-1 einen Einfluss auf das Transkriptionsverhalten der beiden Zielgene. Dieser Effekt steht deutlich mit der enzymatischen Aktivität von PARP-1 in Zusammenhang. Gleichzeitig kann nicht ausgeschlossen werden, dass PARP-1 ebenfalls als physikalischer Interaktionspartner die Transkription der beiden Zielgene moduliert. Für das ATIP-1-Gen wurde dieses Resultat zusätzlich durch den *knockdown* der PARP-1-mRNA mit Hilfe spezifischer siRNA verifiziert.

Der Einfluss der Polymerase PARP-1 auf die Transkription der beiden Ziegene wurde zusätzlich auf der Promotorebene untersucht. Diese Reporterassays haben gezeigt, dass PARP-1 die Aktivität des AT2R-Promotors reprimiert, während die ATIP1-Promotoraktivität durch PARP-1 aktiviert wird. Diese Effekte können auch hier durch die PARP-Inhibierung mittels 3-AB und durch den *knockout* des PARP-1-Gens bestätigt werden. Mit Hilfe der spezifischen Analyse der einzelnen AT2R-Promotorfragmente unter PARP-1-Inhibition konnte erneut die Exon-1-/Intron-1-Region als Regulatorsequenz der PARP-1-vermittelten Effekte identifiziert werden. Fehlt diese Region in dem Promotorfragment, wie bei dem [-1100 bp]-Konstrukt, ist der AT2R-Promotor nicht modulierbar. Der transkriptionelle Einfluss von PARP-1 auf ein *cis*-Element in einer Exon-Intron-Region wurde bereits für das Bcl-6-Gen beschrieben, dessen Transkription durch die Bindung von PARP-1 an die DNA reprimiert wird (Ambrose et al. 2007). PARP-1 kann die DNA über das Erkennen spezifischer Sequenzen direkt kontaktieren (Zhang et al. 2002; Huang et al. 1995; Amiri et al. 2006). Zahlreiche Bindungsmotive sind beschrieben, eine eindeutige Konsensussequenz ist bisher jedoch nicht identifiziert (Ambrose et al. 2007). Die bioinformatische Analyse der AT2R-Promotorsequenz hat gezeigt, dass es keine vollständige Übereinstimmung zu den publizierten PARP-1-Motiven gibt. Zu diesen PARP-1-Motiven zählen beispielsweise 5'-TGTTG-3' (Huang et al. 1995) oder 5'-TTGANNACAA (Zhang et al. 2002). Für den ATIP-1-Promotor konnte dagegen das Sequenzmotiv 5'-TGTTG-3' dreimal in der Promotorsequenz identifiziert werden, jeweils -753 bp, -1059 bp und -1062 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt. In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss einer PARP-1-Überexpression auf die transkriptionelle Regulation der beiden Zielgene untersucht. Diese resultierte in einer Reprimierung der Promotoraktivität des AT2R-Gens sowie in einer Zunahme der ATIP-1-Promotorstärke und führte somit zu gegenteiligen Effekten der inhibitorischen Versuche (Abbildungen 4.24 und 4.25).

Die Interaktion von PARP-1 mit der Ziel-DNA komplementiert beispielsweise die Promotoren von etwa 90% der RNA-Polymerase II transkribierten Genen in MCF-7-Zellen (Krishnakumar et al. 2008). PARP-1 kann beispielsweise durch Wechselwirkungen mit

anderen TFs spezifisch an den Zielpromotor rekrutiert werden. Alternativ kann PARP-1 jedoch auch direkt mit *enhancer*- oder Promotor-DNA interagieren und seinerseits die Anlagerung von TFs an die DNA vermitteln (Kraus 2008; Akiyama et al. 2001). Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation wurde hier der Einfluss von PARP-1 auf die Rekrutierung der RNA-Polymerase II und des Proteins TBP, als typische Komponenten des Transkriptionsapparates, an die Promotoren der beiden Zielgene untersucht. Für diese Analyse wurde die enzymatische PARP-Aktivität mit 3-AB inhibiert. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme der TBP-Rekrutierung am AT2R-Promotor und eine gleichzeitige Abnahme der PARP-1-Bindung am AT2R-Gen. Die ATIP1-Promotoranalyse hat ergeben, dass durch die Inhibierung von PARP die Rekrutierung der RNA-Polymerase II und des Proteins TBP an den ATIP1-Promotor reduziert wird. Der Unterschied in der transkriptionellen Regulation beider Gene durch PARP-1 betrifft demnach die Rekrutierung von TBP, die am AT2R-Promotor verstärkt und am ATIP1-Promotor vermindert erfolgt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe beweisen außerdem eine direkte physikalische Interaktion von PARP-1 mit dem AT2R- und ATIP1-Promotor, die von der enzymatischen Aktivität des Proteins abhängig ist.

5.5.1 Einfluss des PARP-1-*knockouts* auf das AT2R-Gen nach AT2R-Aktivierung

Der AT2R wird im fötalen Gewebe relativ stark exprimiert (Lavoie and Sigmund 2003). Seine Expression nimmt jedoch in der postnatalen Phase signifikant ab und ist nur noch in wenigen Geweben, wie zum Beispiel in adrenalen, renalen oder kardialen Geweben detektierbar (de Gasparo et al. 2000). Basierend auf den Ergebnissen in dieser Arbeit könnte eine mögliche Ursache dafür eine zunehmende Repressorwirkung von PARP-1 nach der Geburt sein. Für die Analyse des PARP-1-Einflusses auf die AT2R-mRNA-Expression unter AT2R-Aktivierung wurden MEFs von PARP-1-*KO*- und WT-Mäusen mit den Agonisten Ang II und Comp21 stimuliert. Anschließend wurde der Transkriptionsspiegel des AT2R-Gens ermittelt. Die AT2R-Aktivierung mit Ang II bei gleichzeitiger AT1R-Inhibierung mit Irbesartan führte in den *KO*-Zellen zu einer Steigerung der AT2R-mRNA-Expression. Die Analyse der Promotoraktivität des AT2R-Gens unter der Stimulation mit Ang II und Comp21 zeigte, dass diese Promotoraktivierung dabei maßgeblich über das [-216 bp]-Konstrukt vermittelt wird. Es wurde jedoch keine Änderung der Promotoraktivität des [-1316 bp]-Konstrukts beobachtet. Die mRNA des AT2R-Gens ist in den WT-Zellen kaum detektierbar, woraus sich auch die großen Standardabweichungen ergeben. Der Vergleich der endogenen AT2R-Transkription hat zu dem Ergebnis geführt, dass der *knockout* des PARP-1-Gens im Vergleich zum WT in einer signifikanten Zunahme der AT2R-mRNA-Expression resultiert (vergleiche Kapitel 4.5.2). Da dieser Anstieg vielfach stärker als derjenige der pharmakologischen AT2R-Aktivierung ist (Abbildung 4.27), zeigte dieser Versuch, dass es sich bei der Repression des AT2R-Gens durch PARP-1 um den gegenüber der Rezeptoraktivierung dominierenden Einfluss handelt. Die Repressorfunktion von PARP-1 ist folglich von besonderer physiologischer und möglicherweise von therapeutischer Bedeutung.

Im Weiteren wurde die Fragestellung untersucht, ob die AT2R-Aktivierung die PARP-1-Expression beeinflusst, das heißt, ob eine reziproke Interaktion zwischen dem AT2R-Gen und dem PARP-1-Gen besteht. Dafür wurde die PARP-1-mRNA-Expression in MEF-Zellen von PARP-1-WT-Mäusen ermittelt, die mit den AT2R-Agonisten Ang II und Comp21 stimuliert wurden. Der Versuch hat zu dem Ergebnis geführt, dass die AT2R-Aktivierung selbst keine Effekte auf die PARP-1-mRNA-Expression ausübt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Szabó et al. (2004) überein. Diese Gruppe konnte zeigen, dass in murinen Endothelzellen Ang II zu der Zunahme der enzymatischen PARP-Aktivität führt, die durch die Inkubation der Zellen mit dem AT1R-Antagonisten Losartan inhibiert werden konnte. Folglich scheint die Ang II vermittelte PARP-Aktivierung über den AT1R zu verlaufen, die dann wiederum regulativ auf den Promotor des AT2R-Gens wirkt.

5.5.2 Endogene mRNA-Expression des AT2R- und des ATBP50-Gens in PARP-1-*knockout*- und Wildtyp-Mäusen

Die endogene mRNA-Expression der beiden Zielgene wurde im Herzen, der Niere und im Gehirn von homozygoten PARP-1-*KO*- und in WT-Mäusen ermittelt. Im Herzen und in der Niere führte der *knockout* zu einer signifikanten Repression der AT2R-mRNA. Im Gehirn wird das AT2R-Gen jedoch in den *KO*-Tieren gegenüber den WT-Tieren stärker exprimiert. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster ist ein Indiz für eine zell- und gewebespezifische AT2R-Regulation durch PARP-1. Da die *in vitro*-Versuche in neuronalen Zellen durchgeführt wurden, ist die Übereinstimmung der Ergebnisse mit den *in vivo*-Daten für das Gehirn eine Bestätigung der beobachteten Regulationsmechanismen. Dieser Zusammenhang müsste jedoch in weiteren Experimenten für die anderen Gewebetypen verifiziert werden.

Eine ähnliche gewebespezifische Regulation durch PARP-1 kann für das ATBP50-Gen angenommen werden. Die mRNA-Expression des ATBP50-Gens nimmt nur im Gehirn der *KO*-Tiere signifikant zu, während in den anderen Geweben kein eindeutiger Einfluss festgestellt wurde. Die Diskrepanz zwischen den *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnissen für das ATBP50-Gen ist dadurch erklärbar, dass für die *in vitro*-Untersuchungen ausschließlich Endothelzellen verwendet wurden, während es sich bei den *in vivo*-Versuchen um komplexere Zellkonglomerate handelte.

5.5.3 Einfluss des intronischen Polymorphismus -G1332A auf die PARP-1-vermittelten Effekte

Der AT2R-Polymorphismus -G1332A wird mit verschiedenen kardialen Erkrankungen assoziiert, wobei die publizierten Ergebnisse diesbezüglich widersprüchlich sind (Schmieder et al. 2001; Alfakih et al. 2004; Warnecke et al. 2005). Vor diesem Hintergrund wurde in

dieser Arbeit der Einfluss von PARP-1 auf die Promotoraktivität des [-216-A bp]- und [-216-G bp]-Konstrukts des AT2R-Gens untersucht. Es hat sich auch innerhalb dieser Versuchsreihe gezeigt, dass die Inhibierung von PARP in einer signifikanten Zunahme der Promotoraktivität beider Konstrukte resultiert. Eine unterschiedliche Wirkung von PARP in Bezug auf das jeweilige Nukleotid wurde jedoch nicht detektiert. Die beobachteten Unterschiede für diesen Polymorphismus stehen folglich nicht im Zusammenhang mit PARP.

6 Zusammenfassung

Das RAS mit seinem Effektorpeptid Ang II ist in die Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten involviert. Ang II induziert seine Wirkung hauptsächlich über die beiden membranständigen Rezeptoren AT1R und AT2R, die gegensätzliche zelluläre Effekte vermitteln. Die Rolle des AT2R innerhalb kardiovaskulärer Erkrankungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ein neu identifiziertes AT2R-*binding*-Protein (ATBP/ATIP) interagiert im Zytoplasma mit dem C-Terminus des AT2R. Diese Wechselwirkung scheint für die AT2R-vermittelte Wachstumsinhibierung essentiell zu sein. Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung transkriptioneller Regulationsmechanismen des AT2R- und des ATIP1-/ATBP50-Gens, da die Kenntnis der Promotorarchitektur und die Charakterisierung des genauen Transkriptionsverlaufs eines Gens zur Aufklärung von Krankheiten beitragen und pharmakologisch-therapeutische Ansatzpunkte liefern kann.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden humane und murine Zellen auf die endogene Expression der beiden Zielgene analysiert. Funktionelle AT2R-Transkripte wurden nur in humanen KELLY-Zellen gefunden. Für die Untersuchungen der regulativen Mechanismen des AT2R-Gens wurden die humanen Zelllinien MCF-7 und KELLY als Modellsysteme ausgewählt. Die Analyse des ATIP1-Gens wurde in MCF-7- und EA.hy926-Zellen durchgeführt. MCF-7-Zellen exprimieren weder das AT2R-Gen noch das ATIP1-Gen und eignen sich daher als Modellorganismus für die Untersuchung der Promotorarchitekturen beider Gene unter basalen Versuchsbedingungen. Das ATIP1-Gen wird von EA.hy926-, SH-Sy5Y sowie KELLY-Zellen transkribiert. Die Expressionsanalyse deutete zusätzlich auf die Existenz eines Pseudogens des AT2R auf den Chromosomen 5 und 7 hin, welches eine 85%ige Homologie zu der AT2R-Sequenz aufweist. Mit Hilfe der RLM-5'-RACE konnte für das humane AT2R-Gen ein transkriptioneller Startpunkt identifiziert werden, der sich 1533 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt und 29 bp *downstream* von der TATA-*box* befindet. Die detaillierte Funktionsanalyse des humanen AT2R-Promotors mittels Deletionsmutanten und Reporterassays hat zu dem Ergebnis geführt, dass die Exon-1-/Intron-1-Region für die Transkription des AT2R-Gens sowohl notwendig als auch hinreichend ist. Fehlt diese Region in der Promotorsequenz, ist der Promotor des AT2R-Gens nahezu inaktiv, obwohl sich der Transkriptionsstartpunkt 2 bp *upstream* vom Exon 1 und damit außerhalb der Exon-1-/Intron-1-Region befindet. Über inverse Klonierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Region nicht um ein *enhancer*-Element handelt, sondern dass dieser Bereich einen zusätzlichen transkriptionellen Startpunkt generiert. Mit der Luziferase-RLM-5'-RACE konnte dieser transkriptionelle Startpunkt 62 bp *upstream* vom Exon 1 lokalisiert werden. Das bedeutet, dass Sequenzen in der Exon-1-/Intron-1-Region

den Transkriptionsapparat rekrutieren und vermutlich durch einen Überhang den Startpunkt generieren. Die entsprechende Untersuchung des ATIP1-Gens resultierte in der Identifikation von zwei transkriptionellen Startpunkten, die 293 bp und 304 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt entfernt sind. Im Gegensatz zum AT2R-Gen enthält das ATIP1-Gen jedoch keine TATA-*box*. Die ubiquitäre Expression des ATIP1-Gens, seine multiplen Startpunkte sowie das Fehlen der TATA-*box* weisen auf eine Funktion als *housekeeping*-Gen für das ATIP1-Gen hin. Die Analyse des intronischen AT2R-Polymorphismus -G1332A zeigte, dass unter basalen Stimulationsbedingungen die Aktivität von Promotoren mit dem G-Allel stärker ist als von Promotoren mit dem A-Allel.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen von AT2R-Polymorphismen weisen darauf hin, dass der AT2R einen protektiven Effekt bei der myokardialen Hypertrophie von Frauen ausübt. In dieser Dissertation wurde der Einfluss des weiblichen Hormons 17-β-Östradiol (E2) auf die transkriptionelle Regulation des humanen AT2R- und ATIP1-Gens auf der Promotorebene untersucht. Die bioinformatische Voruntersuchung führte zu der Identifizierung eines halbseitigen steroidresponsiven Elements im Intron 1, das 1385 bp *upstream* vom Translationsstartpunkt lokalisiert ist. Die bioinformatische Promotoranalyse des ATIP1-Gens zeigte, dass der ATIP1-Promotor weder über EREs noch über steroidresponsive Elemente verfügt. Die experimentellen Untersuchungen des AT2R-Promotors führten zu dem Ergebnis, dass E2 die Promotoraktivität der AT2R-Reporterkonstrukte [-148 bp] und [-216 bp] signifikant verstärkt, auf den gesamten Promotorbereich jedoch keinen signifikanten Einfluss ausübt. Der Promotor des ATIP1-Gens ist dagegen durch E2 nicht modulierbar.

Die endogene Expressionsanalyse der beiden Zielgene in Herzen von gesunden Ratten und gesunden Menschen und die *in vitro*-Untersuchung zeigten übereinstimmend, dass die mRNA-Expression des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens nicht geschlechtsspezifisch reguliert ist (Abbildung 6.1). Die Analyse der Expression im humanen Herzen hat zusätzlich ergeben, dass das Transkriptionsniveau unabhängig vom Alter ist. Die Expression der beiden Zielgene zeigte dagegen vielmehr individuelle Unterschiede.

Im Zusammenhang mit den E2-Untersuchungen wurde auch der Einfluss von E2 auf die Transkription des TFF1-Gens ermittelt, da dieses Gen innerhalb der Untersuchungen als Positivkontrolle der E2-Aktivität dienen sollte. Die Expression der TFF1-mRNA-Expression ist durch einen oszillierenden Verlauf charakterisiert, was bedeutet, dass sich transkriptionell aktive und inaktive Phasen alternierend abwechseln. Die mRNA-Expression war nach der E2-Stimulation im Vergleich zum Vehikel nach 2, 8 und 24 Stunden signifikant erhöht. Die Promotoranalyse des TFF1-Gens zeigte dagegen eine signifikante Reprimierung der TFF1-Promtoraktivität durch E2. Die Kotransfektion eines ERα-Expressionsvektors führte zu einer Aktivierung der TFF1-Promotoraktivität sowohl unter E2- als auch unter der Vehikelstimulation. Der direkte Vergleich zwischen der E2- und Vehikelstimulation zeigte jedoch, dass die Inkubation mit E2 in Bezug auf das jeweilige Vehikel die Promotoraktivität nicht verändert. Auf mRNA-Ebene wurde dagegen eine signifikante Zunahme des

TFF1-Transkriptionsspiegels unter einer E2-Inkubation gemessen. Die Stimulation mit E2 zeigte außerdem einen signifikanten Anstieg der RNA-Polymerase II-Rekrutierung an den TFF1-Promotor, die somit zu einer Transkriptionssteigerung führte. Diese Versuchsreihe machte deutlich, dass die Abnahme der Promotoraktivität des TFF1-Gens und die Zunahme der mRNA-Expression unter E2-Stimulation als Positivkontrolle für die E2-Aktivität verwendet werden kann.

Im fötalen Gewebe ist der AT2R laut Literatur im Vergleich zum AT1R der dominierende Rezeptor. Seine Expression nimmt postnatal dramatisch ab und wird nur noch von wenigen Geweben wie beispielsweise kardialen oder renalen Strukturen exprimiert. Bei kardialen Verletzungen steigt seine Expression jedoch auch im adulten Organismus wieder an. Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen in Herzen von adulten herzinfarktinduzierten Ratten sowie von Patienten mit einer Herzinsuffizienz haben die bekannten Befunde bestätigt. Gleichzeitig haben die Analysen im Tiermodell gezeigt, dass die Behandlung der Tiere mit dem AT2R-Agonsiten Comp21 nach einem Herzinfarkt zu einer Verringerung der AT2R-mRNA-Expression führt, die vergleichbar zu der Expression der Kontrolltiere ist. Die ATIP1-Expression ist im kranken Herzgewebe gegenüber der gesunden Kontrolle signifikant geringer.

Das Protein Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) ist in die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen involviert. Tierexperimente haben gezeigt, dass homozygote PARP-1-*knockout*-Mäuse nach einer Induktion mit Ang II weder kardiale Hypertrophie noch endotheliale Dysfunktionen entwickeln. Im zweiten Schwerpunkt dieser Arbeit wurde der Einfluss von PARP-1 auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens untersucht. Auf mRNA- und Promotorebene konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibierung von PARP und der *knockout* des PARP-1-Gens zu einer Aktivierung der AT2R-Transkription und zu einer Reprimierung der ATIP1-/ATBP50-Transkription führt. Für das ATIP1-Gen wurde dieses Ergebnis weiterhin durch die Verwendung spezifischer siRNA gegen die PARP-1-mRNA bestätigt. Die Überexpression von PARP-1 zeigte sowohl für die Promotoraktivität des AT2R-Gens als auch für die des ATIP1-Gens einen gegensätzlichen Effekt. Sie resultierte in einer Reprimierung der AT2R-Promotoraktivität sowie in einer Aktivierung der Promotoraktivität des ATIP1-Gens. Auf Chromatinebene resultierte die pharmakologische Inhibierung der PARP-Aktivität in einer verstärkten Rekrutierung des Proteins TBP an den Promotor des AT2R-Gens sowie in einer Abnahme der Rekrutierung der RNA-Polymerase II am ATIP1-Promotor. Die *in vivo*-Untersuchung zeigte, dass im Gehirn von PARP-1-*knockout*-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die endogene mRNA-Expression des AT2R-Gens signifikant höher ist. Im Herzen und in der Niere führte der PARP-1-*knockout* verglichen mit dem Wildtyp dagegen zu einer Verringerung der AT2R-Expression. Der PARP-1-*knockout* änderte nur im Gehirn der Tiere die endogene ATBP50-mRNA-Expression, die durch den *knockout* signifikant zunahm. Die durchgeführten Analysen haben gezeigt, dass PARP-1 ein Repressor des AT2R-Gens und ein Aktivator des ATIP1-/ATBP50-Gen ist (Abbildung 6.1).

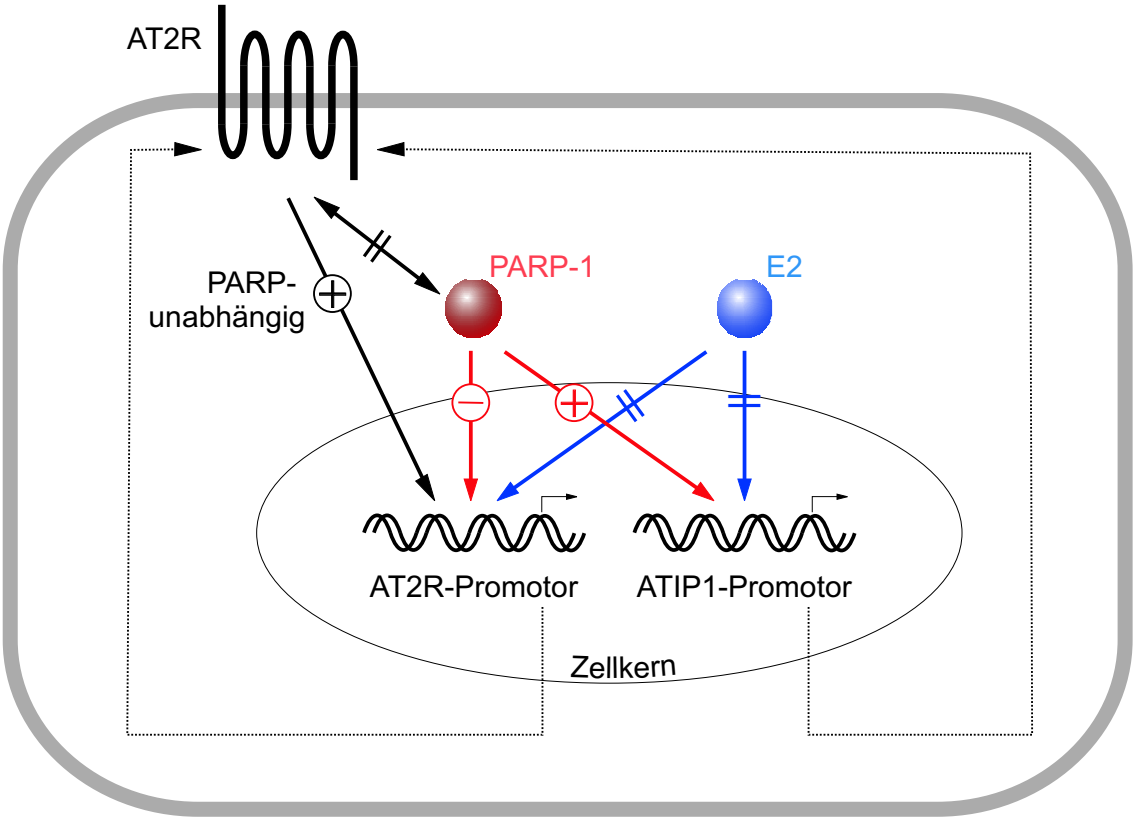


Abbildung 6.1: Transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-Gens. PARP-1 fungiert innerhalb der AT2R-Transkription als Repressor und innerhalb der Transkription des ATIP1-Gens als Aktivator (rot). E2 hat weder einen Einfluss auf die Transkription des AT2R- noch auf die des ATIP1-Gens (blau). PARP-1 selbst wird durch eine AT2R-Aktivierung nicht moduliert. Die Aktivierung des AT2R induziert die Aktivität des AT2R-Promotors über einen PARP-unabhängigen Mechanismus. Die gestrichenen Linien zeigen an, dass sich die betreffende Promotoraktivität direkt auf den Proteinspiegel auswirkt und dass ATIP1 ein direkter Interaktionspartner des AT2R ist.

7 Ausblick

Die Promotoranalyse des humanen AT2R-Gens hat zu der Identifizierung eines klassischen und eines alternativen Transkriptionsstartpunktes geführt. Der hier postulierte molekulare Mechanismus der Transkription über einen alternativen Startpunkt, der sich *upstream* eines TATA-*box*-Elements befindet, ist hypothetisch. Zur detaillierten Aufklärung dieser potenziell neuen Transkriptionsregulation sollten weitere Untersuchungen angeschlossen werden. In weiteren Experimenten könnte beispielsweise die Luziferase-RLM-5'-RACE mit dem inversen AT2R-Konstrukt [-216 bp invers] durchgeführt werden. Der alternative Startpunkt sollte unter diesen Bedingungen nicht generiert werden. Mit Hilfe zeitlich hochauflösender ChIP-Experimente, bei denen spezifische Antikörper gegen Proteine des Transkriptionsapparates verwendet werden, könnte die sequenzielle Rekrutierung von TFs und somit Transkriptionsabfolge des AT2R-Gens über diesen Startpunkt charakterisiert werden.

Das weibliche Sexualhormon E2 hat im gesunden Organismus keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens. Die in dieser Arbeit untersuchten Populationen sind für eine eindeutige Aussage jedoch noch zu klein. Daher müsste die Größe der Patientenkohorten beziehungsweise die Anzahl der untersuchten Tiere gesteigert werden, um die Ergebnisse statistisch weiter abzusichern. Publikationen weisen darauf hin, dass E2 unter pathophysiologischen Bedingungen die Expression des AT2R verstärkt. Die Versuchsreihen könnten daher zusätzlich unter pathologischen Bedingungen durchgeführt werden. Zum Beispiel könnte der Einfluss von E2 auf die Transkription des AT2R-Gens unter einer Ang II-Stimulation untersucht werden oder in Tieren, denen zuvor ein Myokardinfarkt induziert wurde.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben erstmalig gezeigt, dass die Polymerase PARP-1 einen regulativen Einfluss auf die Transkription des AT2R- und ATIP1-/ATBP50-Gens ausübt. Diese Erkenntnis ist von physiologischer und therapeutischer Relevanz und kann beispielsweise bei der Therapie kardiovaskulärer und neuronaler Erkrankungen von Nutzen sein. In diesem Zusammenhang ist die Verfügbarkeit von pharmakologischen PARP-Inhibitoren von besonderer Bedeutung. Verschiedene dieser Wirkstoffe haben bereits die präklinische Entwicklung erfolgreich passiert und sollen bei Schlaganfall, neuronalen Verletzungen, Myokardinfarkt und Herzversagen ihren Einsatz finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Kombination von PARP-Inhibitoren mit AT1R-Antagonisten oder AT2R-Agonisten bei der Therapie kardiovakulärer Erkrankungen eine zukünftige Option sein könnte.

Eine wichtige Erkenntnis der hier durchgeführten Untersuchungen ist weiterhin, dass neben der pharmakologischen PARP-Blockierung die genetische PARP-1-Inhibierung einen therapeutischen Nutzen haben könnte. Die genetische Inhibierung könnte neben dem Einsatz von siRNA beispielsweise durch die Verwendung von *decoy*-Oligonukleotiden erreicht werden. Hierfür wäre die Konsensussequenz der PARP-1-Bindedomäne, über welche die PARP-1-AT2R-Interaktion erfolgt, zunächst zu identifizieren, da diese in der Literatur nicht einheitlich dokumentiert ist. Dieses könnte mit Hilfe eines ChIP-Experiments und anschließender Sequenzierung der immunopräzipitierten und fragmentierten DNA erfolgen.

Literaturverzeichnis

Abdalla, S., Lother, H., el Massiery, A. and Quitterer, U.: 2001, Increased AT(1) receptor heterodimers in preclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness, *Nat Med* **7**, 1003–1009.

Adkins, N., Hagerman, T. and Georgel, P.: 2006, GAGA protein: a multi-faceted transcription factor., *Biochem Cell Biol.* **84**, 559–567.

Akiyama, T., Takasawa, S., Nata, K., Kobayashi, S., Abe, M., Shervani, N., Ikeda, T., Nakagawa, K., Unno, M., Matsuno, S. and Okamoto, H.: 2001, Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation., *PNAS* **98**, 48–53.

Alfakih, K., Lawrance, R., Maqbool, A., Walters, K., Ball, S., Balmforth, A. and Hall, A.: 2005, The clinical significance of a common, functional, X-linked angiotensin II type 2-receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in a cohort of 509 families with premature coronary artery disease., *Eur Heart J.* **26**, 584–9.

Alfakih, K., Maqbool, A., Sivananthan, M., Walters, K., Bainbridge, G., Ridgway, J., Balmforth, A. and Hall, A.: 2004, Left ventricle mass index and the common, functional, X-linked angiotensin II type-2 receptor gene polymorphism (-1332 G/A) in patients with systemic hypertension., *Hypertension.* **43**, 1189–94.

Alvarez-Gonzalez, R. and Althaus, F.: 1989, Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents., *Mutat. Res.* **218**, 67–74.

Ambrose, H., Papadopoulou, V., Beswick, R. and Wagner, S.: 2007, Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) binds in a sequence-specific manner at the Bcl-6 locus and contributes to the regulation of Bcl-6 transcription., *Oncogene* **26**, 6244–6252.

Ame, J., Spenlehauer, C. and de Murcia, G.: 2004, The PARP superfamily, *Bioessays* **26**, 882–893.

Amiri, K., Ha, H., Smulson, M. and Richmond, A.: 2006, Differential regulation of CXC ligand 1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1., *Oncogene* **25**, 7714–7722.

Anderson, M., Scoggin, K., Simbulan-Rosenthal, C. and Steadman, J.: 2000, Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T0-cell leukemia virus type 1 Tax protein., *J Virol.* **74**, 2169–2177.

Armando, I., Jezova, M., Juorio, A., Terrón, J., Falcón-Neri, A., Semino-Mora, C., Imboden, H. and Saavedra, J.: 2002, Estrogen upregulates renal angiotensin II AT(2) receptors, *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F934–43.

Atlas, S.: 2007, The renin-aniotensin-aldosterone system: pathophysiological role and pharmacological inhibition, *JMCP* **13**, 9–20.

Baiardi, G., Macova, M., Armando, I., Ando, H. and Tyurmin, D, S. J.: 2005, Estrogen upregulates renal angiotensin II AT1 and AT2 receptors in the rat, *Regulatory Peptides* **124**, 7–17.

Bautista, R., Sanchez, A., Hernandez, J., Oyekan, A. and Escalante, B.: 2001, Angiotensin II type AT(2) receptor mRNA expression and renal vasodilatation are increased in renal failure., *Hypertension* **38**, 669–673.

Bedecs, K., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A. and Nahmias, C.: 1997, Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase, *Biochem J* **325**, 449–454.

Berk, B.: 2003, Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin, *Sci STKE* **PE16**.

Brasset, E. and Vaury, C.: 2005, Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes, *Heredity* **94**, 571–576.

Brillante, D., Johnstone, M. and Howes, L.: 2005, Effects of intravenous PD123319 on haemodynamic and arterial stiffness indices in healthy volunteers., *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **6**, 102–6.

Bryant, G. and Ptashne, M.: 2003, Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription, *Mol Cell.* **11**, 1301–9.

Burley, S. and Roeder, R.: 1996, Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID)., *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 769–799.

Butler, J. and Kadonaga, J.: 2002, The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression, *Genes & Development* **16**, 2583–2592.

Carey, R. and Siragy, H.: 2003, Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation, *Endocr Rev* **24**, 261–271.

Chambon, P., Weill, J. and Mandel, J.: 1963, Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing enzyme, *Biochem Biophys Res Comm* **11**, 39–43.

Chen, Z. and Manley, J.: 2003, Core promoter elements and TAFs contribute to the diversity of transcriptional activation in vertebrates., *Mol Cell Biol.* **23**, 7350–7362.

Cheung, B., Ong, K. and Man, Y.: 2006, Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension: United States National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2002, *J Clin Hypertens* **8**, 93–98.

Choi, B. and McLaughlin, M.: 2007, Why men's hearts break: cardiovascular effects of sex steroids., *Endocrinol Metab Clin North Am.* **36**, 365–77.

Crofton, J., Ota, M. and Share, L.: 1993, Role of vasopressin, the renin-angiotensin system and sex in Dahl salt-sensitive hypertension, *J Hypertens* **11**, 1031–1038.

D'Amore, A., Black, J. and Thomas, W.: 2005, The AT2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize AT1 receptor-mediated hypertrophy., *Hypertension* **46**, 1347–1354.

de Gasparo, M., Catt, K., Inagami, T., Wright, J. and Unger, T.: 2000, International union of pharmacology. XXIII. the angiotensin II receptors., *Pharmacol Rev.* **52**, 415–72.

De la Chica, S., Corte's, P., Ramirez-Exposito, M., Arias de Saavedra, J., Sanchez-Agesta, R., Perez, M. and Martinez-Martos, J.: 2007, In vivo administration of doxazosin in rats highly decreases serum circulating levels of testosterone through a mechanism involving testicular renin-angiotensin system, *Int J Androl* **15**.

De Paolis, P., Porcellini, A., Gigante, B., Giliberti, R., Lombardi, A., Savoia, C., Rubattu, S. and Volpe, M.: 1999, Modulation of the AT2 subtype receptor gene activation and expression by the AT1 receptor in endothelial cells., *J Hypertens.* **17**, 1873–7.

De Rodrigues, S., dos Santos, R., Silva-Antonialli, M., Scavone, C., Nigro, D., Carvalho, M., de Cássia Tostes, R. and Fortes, Z.: 2006, Differential effect of losartan in female and male spontaneously hypertensive rats., *Life Sci.* **78**, 2280–5.

Deecher, D., Swiggard, P., Frail, D. and O'Connor, L.: 2003, Characterization of a membrane-associated estrogen receptor in a rat hypothalamic cell line (D12)., *Endocrine* **22**, 211–223.

Deinum, J., van Goll, J., Kofflard, M., ten Cate, F. and Danser, A.: 2001, Angiotensin II type 2 receptor and cardiac hypertrophy in women with hypertrophic cardiomyopathy, *Hypertension* **38**, 1278–1281.

Deng, W. and Roberts, S.: 2005, A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB., *Genes Dev.* **19**, 2418–2423.

Di Benedetto, M., Bièche, I., Deshayes, F., Vacher, S., Nouet, S., Collura, V., Seitz, I., Louis, S., Pineau, P., Amsellem-Ouazana, D., Couraud, P., Strosberg, A., Stoppa-Lyonnet, D., Lidereau, R. and Nahmias, C.: 2006, Structural organization and expression of human

MTUS1, a candidate 8p22 tumor suppressor gene encoding a family of angiotensin II AT2 receptor-interacting proteins, ATIP., *Gene.* **380**, 127–36.

Doolan, C. and Harvey, B.: 2003, A G-alpha protein-coupled membrane receptor, distinct from the classical oestrogen receptor, transduces rapid effects of oestradiol on $[Ca2^{+}]_i$ in female rat distal colon., *Mol Cell Endocrinol* **199**, 87–103.

Edwards, D.: 2000, The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors., *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* **5**, 307–324.

Erdmann, J., Guse, M., Kallisch, H., Fleck, E. and V., R.-Z.: 2000, Novel intronic polymorphism (+1675G/A) in the human angiotensin II subtype 2 receptor gene., *Hum Mutat.* **15**, 487.

Falcón, B., Stewart, J., Bourassa, E., Katovich, M., Walter, G., Speth, R., Sumners, C. and Raizada, M.: 2004, Angiotensin II type 2 receptor gene transfer elicits cardioprotective effects in an angiotensin II infusion rat model of hypertension., *Physiol Genomics.* **19**, 255–261.

Falcón, B., Veerasingham, S., Sumners, C. and Raizada, M.: 2005, Angiotensin II type 2 receptor-mediated gene expression profiling in human coronary artery endothelial cells., *Hypertension.* **45**, 692–697.

Feng, Y., Sun, Y. and Douglas, J.: 2002, G-beta gamma-independent constitutive association of G-alpha s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1, *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 12049–12054.

Funke-Kaiser, H., Bolbrinker, J., Theis, S., Lemmer, J., Richter, C., Paul, M. and Orzechowski, H.: 2000, Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1), *FEBS Lett* **466**, 310–6.

Gallinat, S., Yu, M., Dorst, A., Unger, T. and Herdegen, T.: 1998, Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves., *Brain Res Mol Brain Res.* **57**, 111–122.

Gilles, R., Vingerhoedt, N., Howes, J., Griffin, M. and Howes, L.: 2004, Increase in systemic blood pressure during intra-arterial PD123319 infusion: evidence for functional expression of angiotensin type 2 receptors in normal volunteers., *Blood Press.* **13**, 110–4.

Grady, E., Sechi, L., Griffin, C., Schambelan, M. and Kalinyak, J.: 1991, Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus, *J Clin Invest* **88**, 921–933.

Griendling, K., Lassègue, B. and Alexander, R.: 1996, Angiotensin receptors and their therapeutic implications., *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **36**, 281–306.

Grohé, C., Kahlert, S., Löbbert, K., Stimpel, M., Karas, R., Vetter, H. and Neyses, L.: 1997, Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors., *FEBS Lett.* **1**, 107–112.

Gustafsson, J.: 2003, What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling, *Trends Pharmacol Sci* **24**, 479–485.

Hall, J., Couse, J. and Korach, K.: 2001, The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling, *J Biol Chem* **276**, 36869–36872.

Hansen, J., Servant, G., Baranski, T., Fujita, T., Iiri, T. and Sheikh, S.: 2000, Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation, *Circ Res* **87**, 753–9.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M. and Gustafsson, J.: 2007, Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets., *Physiol Rev.* **87**, 905–931.

Hiyoshi, H., Yayama, K., Takano, M. and Okamoto, H.: 2005, Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension., *Hypertension.* **45**, 967–73.

Horiuchi, M., Hayashida, W., Kambe, T., Yamada, T. and Dzau, V.: 1997, Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis, *J Biol Chem* **272**, 19022–6.

Huang, X., Richards, E. and Sumners, C.: 1995, Angiotensin II type 2 receptor-mediated stimulation of protein phosphatase 2A in rat hypothalamic/brainstem neuronal coculture, *J Neurochem* **65**, 2131–2137.

Ichihara, S., Senbonmatsu, T., Price, E., Ichiki, T., Gaffney, F. and Inagami, T.: 2001, Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension., *Circulation.* **104**, 346–51.

Ji, n. J., Nakura, J., Wu, Z., Yamamoto, M., Abe, M., Chen, Y., Tabara, Y., Yamamoto, Y., Igase, M., Bo, X., Kohara, K. and Miki, T.: 2003, Association of angiotensin II type 2 receptor gene variant with hypertension., *Hypertens Res.* **26**, 547–52.

Jones, E., Vinh, A., McCarthy, C., Gaspari, T. and Widdop, R.: 2008, AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease., *Pharmacol Ther.* **120**, 292–316.

Ju, B. and Rosenfeld, M.: 2006, A breaking strategy for topoisomerase II-beta/PARP-1-dependent regulated transcription., *Cell Cycle.* **5**, 2557–60.

Kadonaga, J.: 2005, Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors, *Cell* **116**, 247–57.

Kaschina, E., Grzesiak, A., Li, J., Foryst-Ludwig, A., Timm, M., Rompe, F., Sommerfeld, M., Kemnitz, U., Curato, C., Namsolleck, P., Tschöpe, C., Hallberg, A., Alterman, M., Hucko, T., Paetsch, I., Dietrich, T., Schnackenburg, B., Graf, K., Dahlöf, B., Kintscher, U., Unger, T. and Steckelings, U.: 2008, Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a

novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction?, *Circulation* **118**, 2523–32.

Kaschina, E. and Unger, T.: 2003, Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function., *Blood Press* **12**, 70–88.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. and Chambon, P.: 1995, Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase, *Science* **270**, 1491–1494.

Khoury, S., Yarows, S., O'Brian, T. and Sowers, J.: 1992, Ambulatory blood pressure monitoring in a nonacademic setting, *Am J Hypertens* **5**, 616–623.

Kim, M., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J. and Kraus, W.: 2004, NAD^+-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1, *Cell* **119**, 803–814.

Kong, E., Pike, A. and Hubbard, R.: 2003, Structure and mechanism of the oestrogen receptor, *Biochem Soc Trans* **31**, 56–9.

Kornberg, R.: 2007, The molecular basis of eukaryotic transcription., *PNAS* **104**, 12955–12961.

Kraus, W.: 2008, Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation., *Curr Opin Cell Biol.* **20**, 294–302.

Kraus, W. and Lis, J.: 2003, PARP goes transcription, *Cell* **113**, 677–683.

Krishnakumar, R., Gamble, M., Frizzell, K., Berrocal, J., Kininis, M. and Kraus, W.: 2008, Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes., *Science* **319**, 819–821.

Kuiper, G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.: 1997, Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology* **138**, 863–870.

Kung, A., Chu, E. and Xu, L.: 2009, Bazedoxifene: a new selective estrogen receptor modulator for the treatment of postmenopausal osteoporosis., *Expert Opin Pharmacother.* **10**, 1377–1385.

Lavoie, J. and Sigmund, C.: 2003, Minireview: overview of the renin-angiotensin system - an endocrine and paracrine system., *Endocrinology* **144**, 2179–2183.

Lee, D., Gershenzon, N., Gupta, M., Ioshikhes, I., Reinberg, D. and B.A, L.: 2005, Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1., *Mol Cell Biol.* **25**, 9674–9686.

Li, J., Culman, J., Hörtnagl, H., Zhao, Y., Gerova, N., Timm, M., Blume, A., Zimmermann, M., Seidel, K., Dirnagl, U. and Unger, T.: 2005, Angiotensin AT2 receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury., *FASEB J.* **19**, 617–619.

Li, L., Haynes, M. and Bender, J.: 2003, Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells., *PNAS* **100**, 4807–4812.

Lim, C., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U. and Kadonaga, J.: 2004, The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II., *Genes Dev.* **18**, 1606–1617.

Macari, D., Bottari, S., Whitebread, S., De Gasparo, M. and Levens, N.: 1993, Renal actions of the selective angiotensin AT2 receptor ligands CGP42112B and PD123319 in the sodium-depleted rat., *Eur J Pharmacol.* **249**, 85–93.

Makino, I., Shibata, K., Ohgami, Y., Fujiwara, M. and Furukawa, T.: 1996, Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain, *Neuropeptides* **30**, 596–601.

Meffert, S., Stoll, M., Steckelings, U., Bottari, S. and Unger, T.: 1996, The angiotensin II AT2 receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells, *Mol Cell Endocrinol* **122**, 59–67.

Meisterernst, M., Stelzer, G. and Roeder, R.: 1997, Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro, *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 2261–5.

Mercier, I., Colombo, F., Mader, S. and Calderone, A.: 2003, Ovarian hormones induce tgf-beta(3) and fibronectin mrnas but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation., *Cardiovasc Res.* **3**, 728–739.

Metivier, R., Penot, G., Hübner, M., Reid, G., Brand, H., Kos, M. and Gannon, F.: 2003, Estrogen receptor-α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter, *Cell* **115**, 751–763.

Mighell, A., Smith, N., Robinson, P. and Markham, A.: 2000, Vertebrate pseudogenes, *FEBS Letters* **468**, 109–114.

Miller, J., Anacta, L. and Cattran, D.: 1999, Impact of gender on the renal response to angiotensin II., *Kidney Int.* **55**, 278–85.

Miura, S., Karnik, S. and Saku, K.: 2005, Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation, *J Biol Chem* **280**, 18237–44.

Müller, F., Demény, M. and Tora, L.: 2007, New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors, *J Biol Chem* **282**, 14685–9.

Molnár, A., Tóth, A., Bagi, Z., Papp, Z., Édes, I., Vaszily, M., Galajda, Z., Papp, J., Varró, A., Szüts, V., Lacza, Z., Gerö, D. and Szabó, C.: 2006, Activation of the poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human heart failure, *Mol Med* **12**, 143–152.

Moore, A., Heiderstadt, N., Huang, E., Howell, N., Wang, Z., Siragy, H. and Carey, R.: 2001, Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure in conscious rats., *Hypertension.* **37**, 1285–1291.

Métivier, R., Penot, G., Carmouche, R., Hübner, M., Reid, G., Denger, S., Manu, D., Brand, H., Kos, M., Benes, V. and Gannon, F.: 2004, Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes, *EMBO J* **23**, 3653–66.

Nakajima, M., Hutchinson, H., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R. and Zhang, L.: 1995, The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer, *PNAS* **92**, 10663–10667.

Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzhir, L., Giller, T. and Srae, J.: 2002, Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin, *J Clin Invest.* **109**, 1417–1427.

Nio, Y., Matsubara, H., Murasawa, S., Kanasaki, M. and Inada, M.: 1995, Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction, *J Clin Invest* **95**, 46–54.

Nouet, S., Amzallag, N., Li, J., Louis, S., Seitz, I., Cui, T., Alleaume, A., Di Benedetto, M., Boden, C., Masson, M., Strosberg, A., Horiuchi, M., Couraud, P. and Nahmias, C.: 2004, Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein ATIP, *J Biol Chem* **279**, 28989–97.

Oduro, A., Fritsch, M. and Murdoch, F.: 2008, Chromatin context dominates estrogen regulation of pS2 gene expression, *Exp Cell Res.* **314**, 2796–2810.

Ohkubo, N., Matsubara, H., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Tsutumi, Y., Shibazaki, Y., Iwasaka, T. and Inada, M.: 1997, Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism, *Circulation* **96**, 3954–3962.

Ozono, R., Wang, Z., Moore, A., Inagami, T., Siragy, H. and Carey, R.: 1997, Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney., *Hypertension* **30**, 1238–1246.

Pacher, P. and Szabó, C.: 2007, Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors., *Cardiovasc Drug Rev.* **25**, 235–260.

Perissi, V. and Rosenfeld, M.: 2005, Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 542–554.

Phoon, S. and Howes, L.: 2002, Forearm vasodilator response to angiotensin II in elderly women receiving candesartan: role of AT(2)- receptors., *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **3**, 36–9.

Pillai, J., Gupta, M., Rajamohan, S., Lang, R., Raman, J. and Gupta, M.: 2006, Poly(ADP-ribose)polymerase-1-deficient mice are protected from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **4**, H1545–53.

Prest, S., May, F. and Westley, B.: 2002, The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells., *FASEB* **16**, 592–594.

Ptashne, M.: 2002, *Genes and Signals*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ramirez-Exposito, M. and Martinez-Martos, J.: 2008, Hypertension, RAS, and gender: what is the role of aminopeptidases?, *Heart Fail Rev.* **13**, 355–365.

Reckelhoff, J., Zhang, H. and Srivastava, K.: 2000, Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system, *Hypertension* **35**, 480–483.

Regitz-Zagrosek, V.: 2006, Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease, *Nature Reviews* **5**, 425–38.

Regitz-Zagrosek, V., Lehmkuhl, E., Lehmkuhl, H. and Hetzer, R.: 2004, Gender aspects in heart failure – pathophysiology and medical therapy, *Arch Mal Coeur Vaiss* **97**, 899–908.

Römpler, H., Stäubert, C., Thor, D., Schulz, A., Hofreiter, M. and Schöneberg, T.: 2007, G protein-coupled time travel, *Molecular Interventions* **7**, 17–25.

Rolli, V., Ruf, A., Augustin, A., Schulz, G., Ménissier-de Murcia, J. and de Murcia, G.: 2000, *From DNA damage and stress signalling to cell death: Poly ADP-ribosylation reactions*, 3rd edn, Oxford University Press, Oxford, NY, chapter Poly(ADP-ribose) polymerase: Structure and function, pp. 35–79.

Ropero, A., Alonso-Magdalena, P., Quesada, I. and Nadal, A.: 2008, The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis., *Steroids* **73**, 874–879.

Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J. and Moras, D.: 2000, Estrogen receptor transcription and transactivation structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors, *Breast Cancer Research* **2**, 353–359.

Saavedra, J., Häuser, W., Ciuffo, G., Egidy, G., Hoe, K., Jöhren, O., Sembonmatsu, T., Inagami, T. and Armando, I.: 2001, Increased AT(1) receptor expression and mRNA in kidney glomeruli of AT(2) receptor gene-disrupted mice., *Am J Physiol Renal Physiol.* **280**, F71–8.

Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J. and Safe, S.: 2000, Ligand-, cell-, estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements, *J Biol Chem* **275**, 5379–5387.

Savoia, C., Tabet, F., Yao, G., Schiffrin, E. and Touyz, R.: 2005, Negative regulation of RhoA Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells. role in angiotensin II induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats., *J Hypertens.* **23**, 1037–1045.

Schaefer, B.: 1995, Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends, *Anal Biochem* **227**, 255–73.

Schefe, J., Menk, M., Reinemund, J., Effertz, K., Hobbs, R., Pandolfi, P., Ruiz, P., Unger, T. and Funke-Kaiser, H.: 2006, A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein, *Circ Res* **99**, 1355–66.

Schefe, J., Unger, T. and Funke-Kaiser, H.: 2008, PLZF and the (pro)renin receptor., *J Mol Med.* **86**, 623–627.

Schmieder, R., Erdmann, J., Delles, C., Jacobi, J., Fleck, E., Hilgers, K. and Regitz-Zagrosek, V.: 2001, Effect of the angiotensin II type 2-receptor gene (+1675 G/A) on left ventricular structure in humans., *J Am Coll Cardiol.* **37**, 175–82.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. and De Murcia, G.: 2006, Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule., *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**, 517–528.

Seibold, S., Rudroff, C., Weber, M., Galle, J., Wanner, C. and Marx, M.: 2003, Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22., *FASEB J* **17**, 1180–2.

Senbonmatsu, T., Ichihara, S., Price, E., Gaffney, F. and Inagami, T.: 2000, Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload, *J Clin Invest* **106**, R25–9.

Senbonmatsu, T., Saito, T., Landon, E., Watanabe, O., Price, E., Roberts, R., Imboden, H., Fitzgerald, T., Gaffney, F. and Inagami, T.: 2003, A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy, *EMBO J* **22**, 6471–82.

Siragy, H., Jaffa, A., Margolius, H. and Carey, R.: 1996, Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production., *Am J Physiol.* **271**.

Sjöberg, L., Kaaja, R. and Tuomilehto, J.: 2004, Epidemiology of postmenopausal hypertension, *Int J Pract Suppl* **139**, 4–12.

Smale, S. and Kadonaga, J.: 2003, The RNA polymerase II core promoter, *Annu Rev Biochem* **72**, 449–479.

Soldatenkov, V., Chasovskikh, S., Potaman, V., Trofimova, I., Smulson, M. and Dritschilo, A.: 2002, Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences., *J Biol Chem.* **277**, 665–670.

Song, R. and Santen, R.: 2006, Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer, *Biol Reprod* **75**, 9–16.

Stanczyk, F.: 1991, *Infertility Contraception and Reproductive Endocrinolog*, 3rd edn, Blackwell Scientific Publications, Cambridge, MA, chapter Steroid hormones, pp. 55–59.

Steckelings, U., Henz, B., Wiehstutz, S., Unger, T. and Artuc, M.: 2005, Differential expression of angiotensin receptors in human cutaneous wound healing, *Br J Dermatol* **153**, 887–893.

Steiner, A.: 2009, Clinical implications of ovarian reserve testing., *Obstet Gynecol Surv.* **64**, 120–128.

Stoll, M., Hahn, A., Jonas, U., Zhao, Y., Schieffer, B., Fischer, J. and Unger, T.: 2002, Identification of a zinc finger homoeodomain enhancer protein after AT(2) receptor stimulation by differential mRNA display., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **22**, 231–7.

Stoll, M., Steckelings, U., Paul, M., Bottari, S., Metzger, R. and Unger, T.: 1995, The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells, *J Clin Invest* **95**, 651–657.

Suarez, C., Diaz-Torga, G., González-Iglesias, A., Cristina, C. and Becu-Villalobos, D.: 2004, Upregulation of angiotensin II type 2 receptor expression in estrogen-induced pituitary hyperplasia., *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **286**, E786–94.

Sun, J., Spencer, V., Li, L., Chen, Y., Yu, J. and Davie, J.: 2005, Estrogen regulation of trefoil factor 1 expression by estrogen receptor alpha and sp proteins., *Exp Cell Res.* **302**, 96–107.

Szabó, C., Pacher, P., Zsengellér, Z., Vaslin, A., Komjáti, K., Benkö, R., Chen, M., Mabley, J. and Kollai, M.: 2004, Angiotensin II-mediated endothelial dysfunction: role of poly(ADP-ribose) polymerase activation, *Mol Med* **10**, 28–35.

Thom, T., Haase, N. and Rosamond, W.: 2006, Heart disease and stroke statistics -2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation* **113**, 85–115.

Thomas, M. and Chiang, C.-M.: 2006, The general transcription machinery and general cofactors., *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **41**, 105–178.

Tsai, F. and Sigler, P.: 2000, Structural basis of preinitiation comples assembly on human pol II promoters., *EMBO J.* **19**, 5–36.

Tsang, L., Chan, L., Liu, C. and Chan, H.: 2001, Effect of phenol red and steroid hormones on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse endometrial epithelial cells, *Cell Biol Int* **25**, 1021–4.

Turner, H. and Wass, J.: 2002, *Oxford Handbook of Endocrinology and Diabetes*, Oxford University Press, Oxford.

Unger, T. and Li, J.: 2004, The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure., *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **5 Suppl 1**, 7–10.

Urban, J., Clarke, W., von Zastrow, M., Nichols, D., Kobilka, B., Weinstein, H., Javitch, J., Roth, B., Christopoulos, A., Sexton, P., Miller, K., Spedding, M. and Mailman, R.: 2007, Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology., *J Pharmacol Exp Ther.* **320**, 1–13.

Virág, L. and Szabó, C.: 2002, The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors., *Pharmacol Rev.* **54**, 375–429.

Volpe, M., Musumeci, B., De Paolis, P., Savoia, C. and Morganti, A.: 2003, Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease?, *J Hypertens* **21**, 1429–43.

Warnecke, C., Mugrauer, P., Sürder, D., Erdmann, J., Schubert, C. and Regitz-Zagrosek, V.: 2005, Intronic ang II type 2 receptor gene polymorphism 1675 G/A modulates receptor protein expression but not mRNA splicing, *Am J Physiol Integr Comp Physiol* **289**, R1729–R1735.

Warnecke, C., Willich, T., Holzmeister, J., Bottari, S., Fleck, E. and Regitz-Zagrosek, V.: 1999, Efficient transcription of the human angiotensin II type 2 receptor gene requires intronic sequence elements, *Biochem J* **340**, 17–24.

Watanabe, T., Akishita, M., He, H., Miyahara, Y., Nagano, K., Nakaoka, T., Yamashita, N., Kozaki, K. and Ouchii, Y.: 2003, 17β-estradiol inhibitis cardiac fibroblast growth through both subtypes of estrogen receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**, 454–459.

Welboren, W., Stunnenberg, H., Sweep, F. and Span, P.: 2007, Identifying estrogen receptor target genes., *Mol Oncol.* **1**, 138–143.

Widdop, R., Jones, E., Hannan, R. and Gaspari, T.: 2003, Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype, *Br J Pharmacol* **140**, 809–824.

Widdop, R., Vinh, A., Henrion, D. and Jones, E.: 2008, Vascular angiotensin AT2 receptors in hypertension and ageing., *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **35**, 386–390.

Wiinberg, N., Hoegholm, A., Christensen, H., Bang, L., Mikkelsen, K., Nielsen, P., Svendsen, T., Kampmann, J., Madsen, N. and Bentzon, M.: 1995, 24 h ambulatory blood

pressure in 352 normal danish subjects, related to age and gender, *Am J Hypertens* **8**, 978–986.

Wruck, C., Funke-Kaiser, H., Pufe, T., Kusserow, H., Menk, M., Schefe, J., Kruse, M., Stoll, M. and Unger, T.: 2005, Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated golgi protein, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **5**, 57–64.

Xu, J., Carretero, O., Liu, Y., Shesely, E., Yang, F., Kapke, A. and Yang, X.: 2002, Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice., *Hypertension.* **40**, 244–50.

Yan, C. and Boyd, D.: 2006, Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression., *Mol Cell Biol* **26**, 6357–6371.

You, D., Loufrani, L., Baron, C., Levy, B., R.E., W. and Henrion, D.: 2005, High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats., *Circulation.* **111**, 1006–11.

Zhang, J. and Pratt, R.: 1996, The AT2 receptor selectively associates with Gi-alpha2 and Gi-alpha3 in the rat fetus, *J Biol Chem* **271**, 15026–33.

Zhang, Z., Hildebrandt, E., Simbulan-Rosenthal, C. and Anderson, M.: 2002, Sequence-specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the human T cell leukemia virus type-I tax responsive element., *Virology* **296**, 107–116.

Zhao, H., Hart, L., Keller, U., Holth, L. and Davie, J.: 2002, Characterization of stably transfected fusion protein GFP-estrogen receptor-alpha in MCF-7 human breast cancer cells., *J Cell Biochem.* **86**, 365–375.

A Tabellen

Tabelle A.1: Chemikalienliste

Bezeichung	Lieferant
ABI-Power-Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Acrylamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agar	Merck
Agarose	Merck
Ammoniumpersulfat	Merck
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin	Sigma, Hamburg, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Complete Proteinaseinhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Deoxycholic acid (Sodium Salt)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiotreitol (DTT)	Roth
DMEM	Invitrogen
dNTPs	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylenediamin Tetraacetic Acid (EDTA)	Roth
Formaldehyd	Roth
Glycerol	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogensulfat	Merck
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
N, N, N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth

Tabelle A.1: Chemikalienliste

Bezeichung	Lieferant
N', N'-Bis-Methylenacrylamid	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumahydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Nonidet P40 (NP40)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenol	Merck
Tris-HCL	Roth
Trizol	Invitrogen
Tween 20	Roth

Tabelle A.2: Reagenzien in der Zellkultur

Bezeichung	Lieferant
β-Mercaptoethanol	Invitrogen
17β-Östradiol	Sigma-Aldrich (E2257)
Charcoaldextran behandeltes FCS	Invitrogen
Cyclodextrin-*encapsulated* 17β-Östradiol	Sigma-Aldrich (E4389)
Cyclodextrin	Sigma (C0926)
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
GeneJuice Transfektionsreagenz	Novagen
HAT	Invitrogen
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
4,5 g/l glukosehaltiges DMEM	Invitrogen
Lipofektamin	Invitrogen
pGL3-*basic*-Vektor	Promega
Natriumpyruvat	Invitrogen
Nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen
Optimem	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Phenolrofreies Medium DMEM	Invitrogen
Poly-*L*-Lysin	Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle A.2: Reagenzien in der Zellkultur

Bezeichung	Lieferant
PBS-Puffer	Invitrogen
RPMI 1640-Medium	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Trypanblau PBS-Mischung	Invitrogen

Tabelle A.3: Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des humanen AT2R-Gens

sense-Primer	*antisense*-Primer	Produktgröße
5'-gaggagggtacc ctggcaagggttcataagtcagccc-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	316 bp
5'-gaggagggtacc gaaaaaaggaagagaaaattctgta-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	516 bp
5'-gaggagggtacc agccaacaaaaactgcgcaaagcaa-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	716 bp
5'-gaggagggtacc tggttgtgtagtttattgcccccac-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	916 bp
5'-gaggagggtacc gagctgggtttgtaaagccaggtag-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	1116 bp
5'-gaggagggtacc atagcttgtaatagcacctaccata-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	1316 bp
5'-gaggagggtacc acgtcccagcgtctgagagaacgag-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	216 bp
5'-gaggaggaagctt acgtcccagcgtctgagagaacgag-3'	5´-gaggagggtacc gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	216 bp (invers)
5'-gaggagggtacc taagtatgaacaatttatatataat-3'	5'-gaggaggaagctt gtaagagaaacagcagctaaataat-3'	148 bp
5'-gaggagggtacc atagcaagtaatagcacctaccata-3'	5'-gaggaggaagctt aatagcaccagatctctggtttcct-3'	1100 bp

Tabelle A.4: Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des ATIP1-Gens

sense-Primer	*antisense*-Primer	Produktgröße
5'-gaggagggtacc gtatttcttggccttgaagagtac-3'	5'-gaggaggaagctt gtcttcggagcaggtggcgagattt-3'	100 bp
5'-gaggagggtacc	5'-gaggaggaagctt	300 bp

Tabelle A.4: Primer für die Subklonierung der Promotorkonstrukte des humanen ATIP1-Gens *Fortsetzung*.

sense-Primer	*antisense*-Primer	Produktgröße
agcatgcacagtgtgatgtggt-3'	gtcttcggagcaggtggcgagattt-3'	
5'-gaggagggtacc acacagtttactttcaggaaatcc-3'	5'-gaggaggaagctt gtcttcggagcaggtggcgagattt-3'	500 bp
5'-gaggagggtacc cttttgacaatctgtcattaatatatt-3'	5'-gaggaggaagctt gtcttcggagcaggtggcgagattt-3'	700 bp
5'-gaggagggtacc gaaagaccactataagagaccac-3'	5'-gaggaggaagctt gtcttcggagcaggtggcgagattt-3'	900 bp
5'-gaggagggtacc tattcgtggtttaatggaattagct-3'	5'-gaggaggaagctt gtcttcggagcaggtggcgagattt-3'	1100 bp

Tabelle A.5: Primer der RLM-5'-RACE

sense-Primer	*antisense*-Primer	
"GeneRacer 5' Primer" (im Kit mitgeliefert)	5'-cacagcgaggttgaagatgt-3' AT2R	erste Runde der PCR
"GeneRacer 5' Primer" (im Kit mitgeliefert)	5'-gagctgcaggataaatccac-3' ATIP1	erste Runde der PCR
"GeneRacer 5' Primer" (im Kit mitgeliefert)	5'-ctcgatatgtgcatctgtaaaagca-3' pGL3-*basic*-Reportervektor	erste Runde der PCR
"GeneRacer 5' *nested*-Primer"	5'-gtgaagaccgctggtaatgt-3' AT2R	zweite Runde der PCR
"GeneRacer 5' *nested*-Primer"	5'-acagtgcttctcctaaaccc-3' ATIP1	zweite Runde der PCR
"GeneRacer 5' *nested*-Primer"	5'-cttcatagccttatgcagttgctc-3' pGL3-*basic*-Reportervektor	zweite Runde der PCR

Tabelle A.6: Primer im Rahmen der Chromatin-Immunopräzipitation

Name	*sense*-Primer	*antisense*-Primer
ATP1-Promotor Transkriptionsstart	5'-aggatctgtgacattattggtt-3'	5'-aaaatgatgctcttcctctgaa-3'
ATP1-Promotor *upstream*-Bereich	5'-aagtgggcatattgttgttgtt-3'	5'-gtctcttatagtggtctttcaa-3'
humaner AT2R-Promotor	5'-agctggcaagggttcataag-3'	5'-caggctgcagaatgctttga-3'

Tabelle A.6: Primer im Rahmen der Chromatin-Immunopräzipitation *Fortsetzung*.

Name	*sense*-Primer	*antisense*-Primer
Transkriptionsstart		
humaner AT2R-Promotor *upstream*-Bereich	5'-ctaggcatgattttaggcact-3'	5'-caaacccagctctaccactt-3'
humaner β-Aktin-Promotor Transkriptionsstart	5'-aatgctgcactgtgcggcga-3'	5'-ggcggatcggcaaaggcga-3'
humaner TFF1-Promotor Transkriptionsstart	5'-tctgtctatcagcaaat-3'	5'-ttgcctcctctctgctccaaa-3'

Tabelle A.7: Primer der Expressionsanalyse der *real-time*-PCR

Name	*sense*-Primer	*antisense*-Primer
AT2R (human, 107 bp)	5'-aacattaccagcggtcttcac-3'	5'-ggaattgcatctaaatgcttatctgatggt-3'
AT2R (Ratte, 80 bp)	5'-aatccctggcaagcatcttatgt-3'	5'-cggaaataaaatgttggcaatg-3'
AT2R (Maus, 100 bp)	5'-agggagctcggaactgaaag-3'	5'-ttgccagtgtttaaagcagttatc-3'
PARP-1 (Maus, 151 bp)	5'-gcagcgagagtattcccaag-3'	5'-aagccatccacctcaacatc-3'
ATIP1 (human, 86 bp)	5'-tgcttcgaaaccttcgactt-3'	5'-gaggattcttttgcctgctc-3'
ATBP50 (Ratte, 115 bp)	5'-tgggctcaggaaaaacactg-3'	5'-cctttcggtggacagcacat-3'
ATBP50 (Maus, 107 bp)	5'-ggctcaggaaaaacactgtca-3'	5'-ggaggacagcacatctggag-3'
18S rRNA (human, Ratte, Maus, 108 bp)	5'-ccgcagctaggaataatggaata-3'	5'-tctagcggcgcaatacgaat-3'
β-Aktin (Maus, 107 bp)	5'-gacaggatgcagaaggagattactg-3'	5'-gctgatccacatctgctggaa-3'

Tabelle A.8: Primer der Expressionsanalyse der qualitativen PCR

Name	*sense*-Primer	*antisense*-Primer
AT2R (human, 263 bp)	5'-ctgctgttgttctggccttcat-3'	5'-actctctcttttcccttggagcc-3'
AT2R (Ratte, 280 bp)	5'-gataatctcaacgcaactgg-3'	5'-gcttgcaaacatgttcaggg-3'
AT1R (human, 465 bp)	5'-catatttgtcatgattcctactt-3'	5'-gcacaaactgtaatattggtgt-3'
AT1aR (Ratte, 405 bp)	5'-accaggtcaagtggatttcg-3'	5'-cacactggcgtagaggttga-3'
AT1bR (Ratte, 398 bp)	5'-ggttccccaccaaatattca-3'	5'-agtgagctgcttagcccaaa-3'
ATIP1 (human, 488 bp)	5'-tgcttcgaaaccttcgactt-3'	5'-gcttttcatactccctggtg-3'
ATBP50 (Ratte, 472 bp)	5'-caccatccacgtccgcctaa-3'	5'-ctgatgctgctggtttagtttc-3'

Tabelle A.7: Primer der Expressionsanalyse der qualitativen PCR *Fortsetzung*.

Name	*sense*-Primer	*antisense*-Primer
ATBP50 (Maus, 107 bp)	5'-ggctcaggaaaaacactgtca-3'	5'-ggaggacagcacatctggag-3'
ERα (human, 540 bp)	5'-atgaccatgaccctcaacaccaa-3'	5'-cttggcagattccatagccatac-3'
ERα (Ratte, 453 bp)	5'-acatgagagctgccaacctt-3'	5'-ggaatcgaccttgacgtagcc-3'
ERβ (human, 279 bp)	5'-tacagcattcccagaaatgtcac-3'	5'-gaagtgagcatccctctttgaac-3'
ERβ (Ratte, 304 bp)	5´-gagcaaagccaagagaaacg-3´	5'-cagtcccaccattagcacct-3'
TFF1 (human, 323 bp)	5'-caccatggagaacaaggtga-3'	5'-ccgagctctgggactaatca-3'

B Vektorkarten

B.1 phRL-null-Vektor

Der Renilla-Luziferase-Reportervektor:

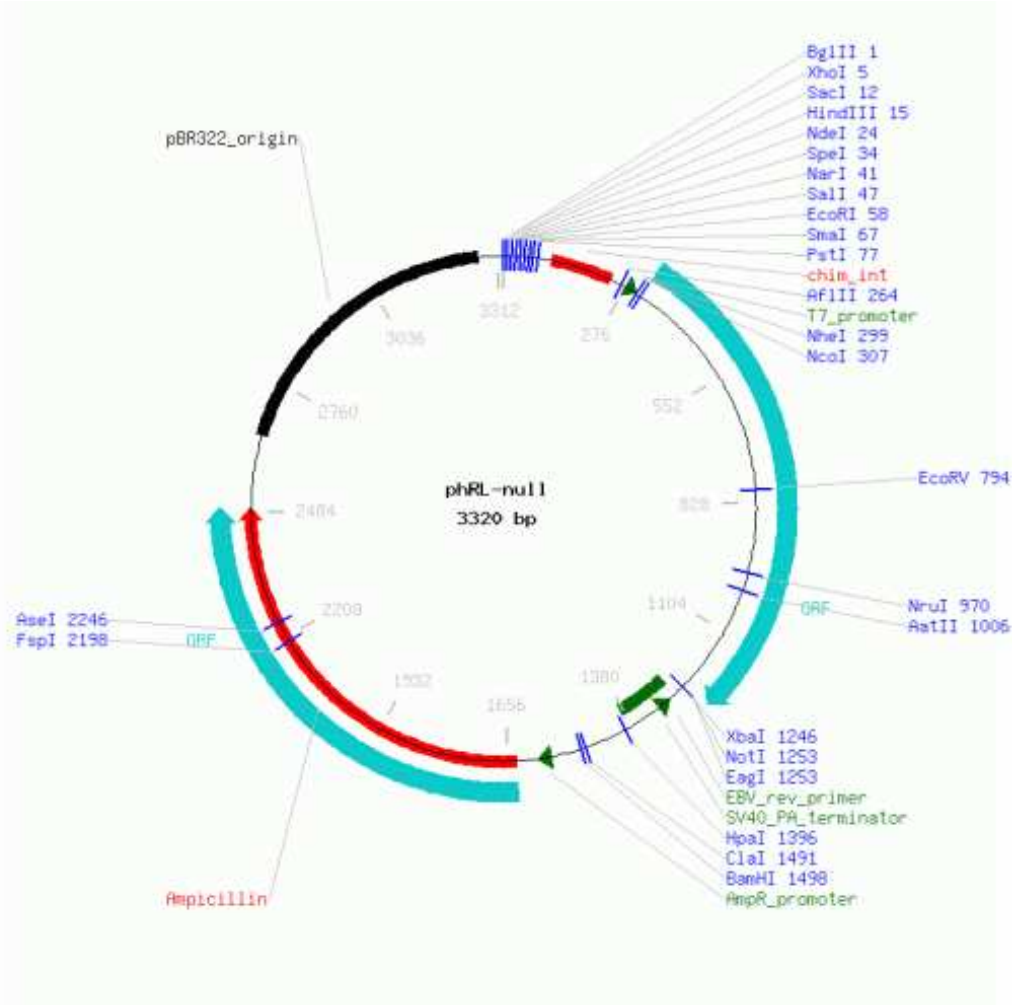


Abbildung B.1: Vektorkarte des phRL-null-Vektors von Promega

B.2 pGL3-*basic*-Vektor

Der Vektor pGL3-*basic*:

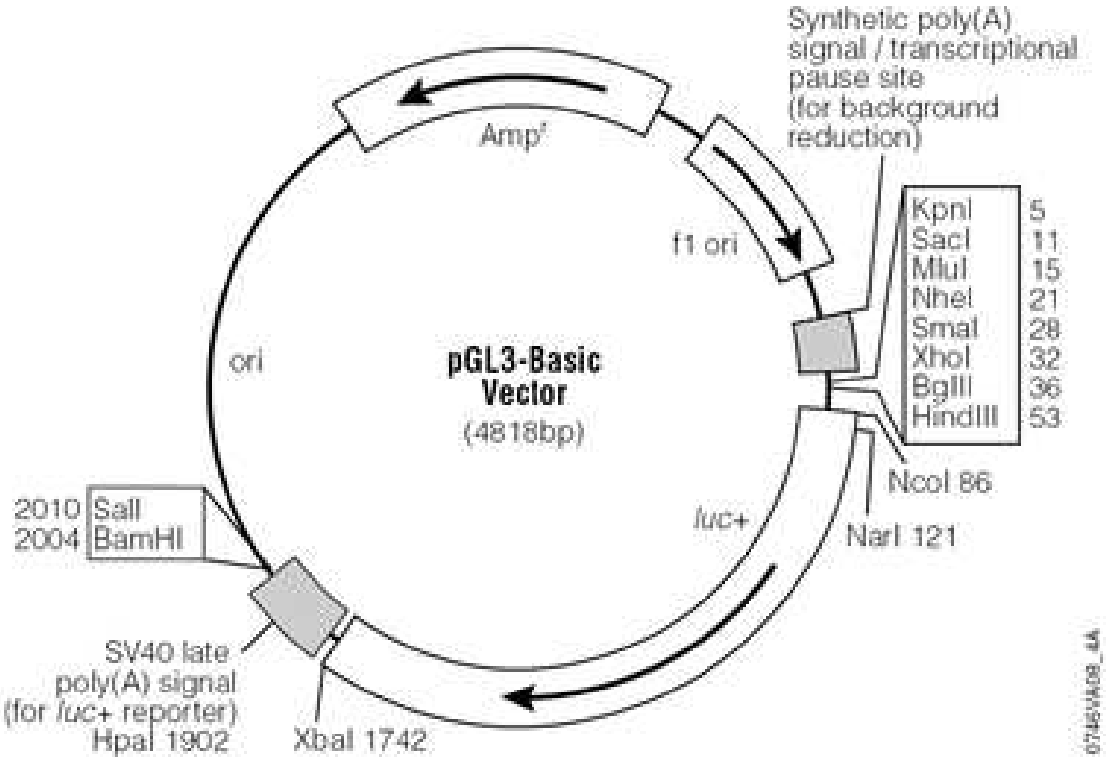


Abbildung B.2: Vektorkarte des Vektors pGL3-*basic* von Promega

B.3 pGEM-T-*easy*-Vektor-System

Der pGEM-T-*easy*-Vektor:

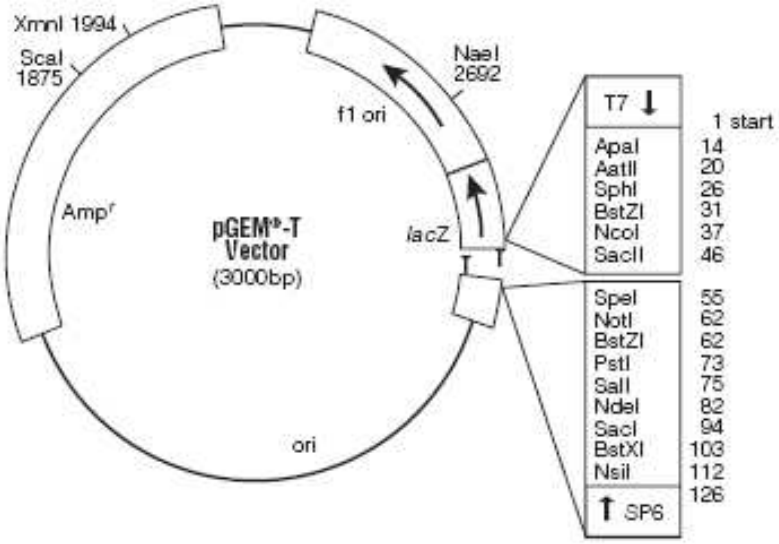


Abbildung B.3: Vektorkarte des Vektors pGEM-T-*easy* von Promega

B.4 pcDNA3.1-V5-His-TOPO

Der pcDNA3.1-V5-His-TOPO-Vektor:

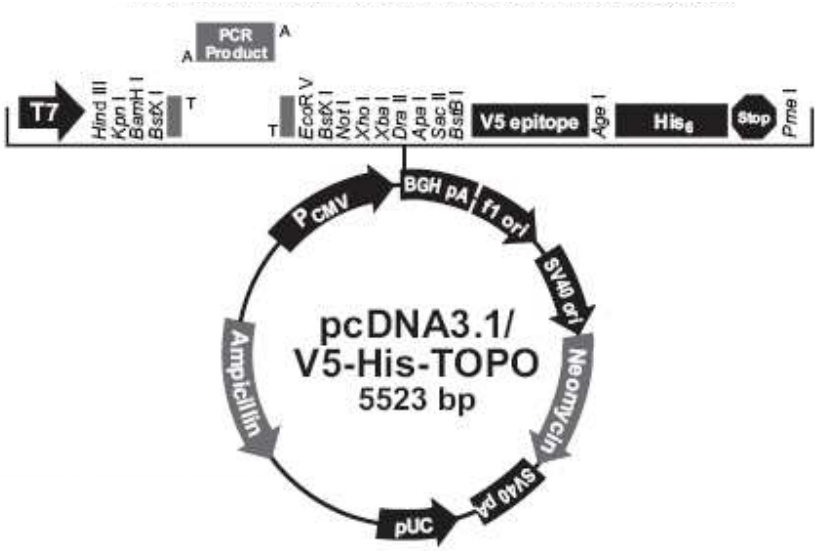


Abbildung B.4: Vektorkarte des Vektors pcDNA3.1-V5-His-TOPO von Invitrogen

B.5 HEG0/pSG5

Der Vektor HEG0/pSG5:

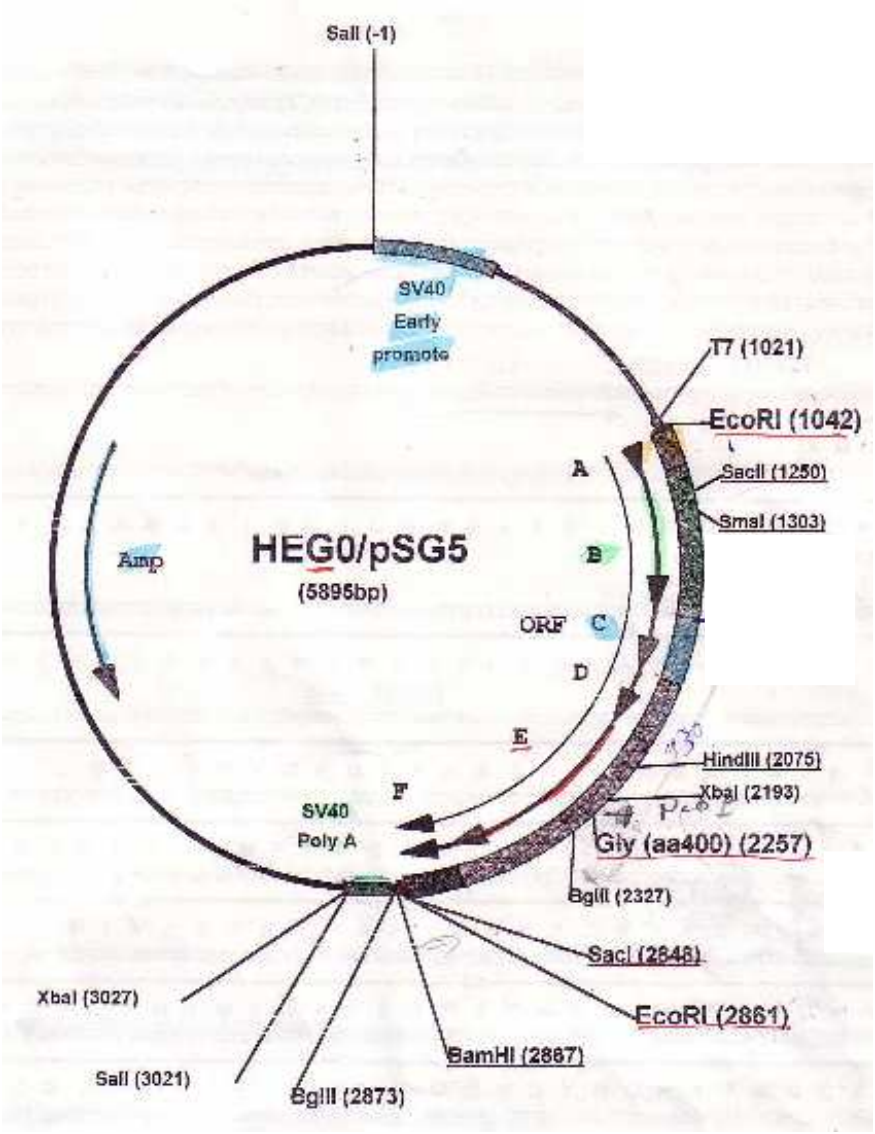
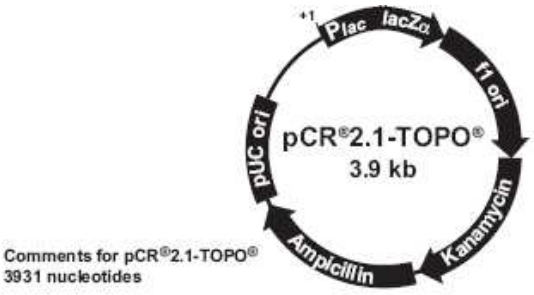


Abbildung B.5: Vektorkarte des Vektors HEG0/pSG5

B.6 TOPO-TA-*cloning*-Vektor



Comments for pCR®2.1-TOPO®
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

Abbildung B.6: Vektorkarte des TOPO-TA-*cloning*-Vektors

C Publikationsliste

C.1 Artikel in Fachzeitschriften

Teile der vorgelegten Arbeit wurden bereits vorveröffentlicht:

Reinemund J., Seidel K., Steckelings U.M., Zaade D., Klare S., Rompe F., Katerbaum M., Schacherl J., Li Y., Menk M., Schefe J.H., Goldin-Lang P., Szabo C., Olah G., Unger T., Funke-Kaiser H. (2009): Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) transcriptionally regulates angiotensin AT2 receptor (AT2R) and AT2R binding protein (ATBP) genes.
Biochem Pharmacol., **77**, 1795-1805

Funke-Kaiser H., **Reinemund J.**, Steckelings U.M., Unger T. (2009): Adapter proteins and promoter regulation of the angiotensin II type 2 receptor - implications for cardiac pathophysiology.
J Renin Angiotensin Aldosterone Syst., **11**, 7-17

Weitere Publikationen:

Seidel K., Kirsch S., Lucht K., Zaade D., **Reinemund J.**, Schmitz J., Klare S., Li Y., Schefe J.H., Schmerbach K., Goldin-Lang P., Zollmann F.S., Thöne-Reineke C., Unger T., Funke-Kaiser H. (2011): The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein exerts neuroprotective effects in neuronal cells and is dysregulated in experimental stroke.
Brain Pathology., **21**, 31-43

Menk M., Haefen C.v., Funke-Kaiser H., Sifringer M., Schefe J.H., Kirsch S., Seidel K., **Reinemund J.**, Steckelings U.M., Unger T., Spies C.D. (2010): Ethanol-induced downregulation of the angiotensin AT2 receptor in murine fibroblasts is mediated by PARP-1.
Alcohol., **44**, 495-506

Schefe J.H., Menk M., **Reinemund J.**, Effertz K., Hobbs R.M., Pandolfi P.P., Ruiz P., Unger T., Funke-Kaiser H. (2006): A Novel Signal Transduction Cascade Involving Direct Physical Interaction of the Renin/Prorenin Receptor with the Transcription Factor Promyelocytic Zinc Finger Protein.
Circulation Research, **12**, 1355-1356

C.2 Kongressbeiträge

Reinemund J., Artuc M., Henz B.M., Unger T., Steckelings U.M.: Angiotensin II suppresses TNFα-induced IL-6 mRNA expression via the AT2-Receptor in human dermal fibroblasts. Poster
ESH, XV European Meeting on Hypertension, Milan, Italy, 17.06.-21.06.2005
Travel Grant

Reinemund J., Artuc M., Henz B.M., Unger T., Steckelings U.M.: Angiotensin II suppresses TNFα-induced IL-6 mRNA expression via the AT2-Receptor in human dermal fibroblasts. Poster
10th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research,
Nice, France, 14.10.-16.10.2005
Posteraward

Reinemund J., Katerbaum M., Isensee J., Steckelings U.M., Funke-Kaiser H., Unger T.: Transcriptional Regulation of AT2R and ATBP by Estrogens. Poster
ESH, XVI European Meeting on Hypertension,
Madrid, Spain, 12.06.-15.06.2006

Reinemund J., Katerbaum M., Isensee J., Steckelings U.M., Funke-Kaiser H., Unger T.: The Influence of Estrogens on the Transcriptional Regulation of human AT2R and human ATBP. Poster
11th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research,
Nice, France, 29.09.-01.10.2006

Reinemund J., Katerbaum M., Isensee J., Steckelings U.M., Unger T., Funke-Kaiser H.: Transcriptional Regulation of AT2R and ATBP. Poster
ESH, XVII European Meeting on Hypertension,
Milan, Italy, 15.06.-19.06.2007

Reinemund J., Steckelings U.M., Katerbaum M., Schacherl J., Schefe J.H., Unger T., Funke-Kaiser H..: Transcriptional Regulation of AT2R and ATBP. Poster
ESH, XVIII European Meeting on Hypertension,
Berlin, Germany, 14.06.-19.06.2007

D Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Heiko Funke-Kaiser für die direkte Betreuung meiner Arbeit, die angenehme Atmosphäre, die wertvollen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit. Ich habe seine wertvollen Anregungen und Ratschläge sehr geschätzt.

Für die Betreuung dieser Doktorarbeit am Institut für Biotechnologie der TU Berlin bin ich Herrn Professor Dr. Roland Lauster sehr dankbar.

Ich möchte Herrn Professor Dr. Thomas Unger sehr herzlich für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas danken und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institute for Cardiovascular Research, Institut für Pharmakologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchführen zu können.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Ulrike M. Steckelings für die Unterstützung meiner Tätigkeit am CCR bedanken.

Für das Korrekturlesen des Manuskripts danke ich Dr. Petra Goldin-Lang.

Ich danke Yaosi Lee, Franziska Rompe, Kerstin Seidel, Sebastian Kirsch, Jens Schacherl, Anna Foryst-Ludwig und Marlen Katerbaum von ganzem Herzen für die unvergessliche Zeit, die Zusammenarbeit und die daraus entstandene, für mich sehr wichtige Freundschaft.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern am CCR für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Unterstützung bedanken.

Meiner Familie danke ich sehr herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Freund Dr. Heiko Andresen danke ich von ganzem Herzen für seine unermüdliche Unterstützung und für seine Motivation. Ich weiß mein Glück zu schätzen.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.