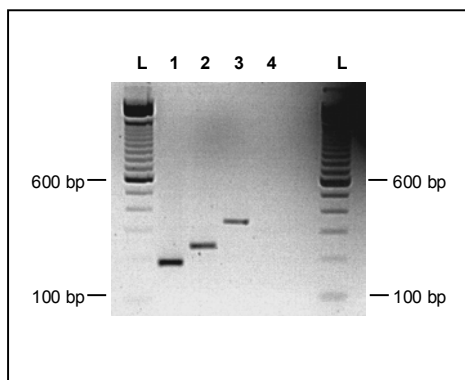


## 6 Ergebnisse

### 6.1 Klonierung des humanen ECE-1c Promotors

Um den ECE-1c-spezifischen Promotor zu klonieren, wurde eine Nukleotid-Datenbank (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) mit Hilfe der veröffentlichten Sequenz von Exon 1c (Acc. Nr.: X98272) im Suchalgorithmus BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) durchsucht. Gefunden wurde ein humaner genomischer Klon (Acc. Nr.: AL031728), der das gesamte ECE-1 Gen mit der fakultativen Promotorregion im 5'-Bereich enthielt. Basierend auf dieser Sequenz konnte die bis dahin unbekannte Länge des Introns zwischen Exon 1c und 1b mit 55 kbp exakt bestimmt werden. Um sicher zu gehen, daß es sich bei der genomischen Sequenz aufwärts des putativen Exons 1c tatsächlich um die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) handelt, erfolgte eine RT-PCR mit sense-Primern 89, 142 und 240 Nukleotide 5' des ATG in Exon 1c und einem antisense-Primer in Exon 2. Zur besseren Orientierung über die genomische Struktur des ECE-1c Gens, den Lokalisationen der Primer sowie die zu erwartende Länge des Produktes sei auf **Abb. 2** unter **3.2.1** verwiesen. Das Ergebnis der Gelelektrophorese mit Banden bei etwas unterhalb von 200 bp, oberhalb von 200 bp und oberhalb von 300 bp entsprach den theoretisch berechneten Längen aus 89, 142 und 240 bp untranslatierter Region, den 3 Basen des putativen Translationsstartkodons in Exon 1c und 87 bp Exon 2 (**Abb. 7**). Die sich anschließende Sequenzierung bestätigte die Existenz dieser Transkripte.



**Abb. 7:** RT-PCR mit cDNA aus HUVEC zur Bestätigung der genomischen Sequenz als 5'-UTR des ECE-1c Gens; 1: sense-Primer promS-89, 2: sense-Primer promS-142; 3: sense-Primer promS-240, 4: Negativkontrolle, L: 100 bp-Leiter

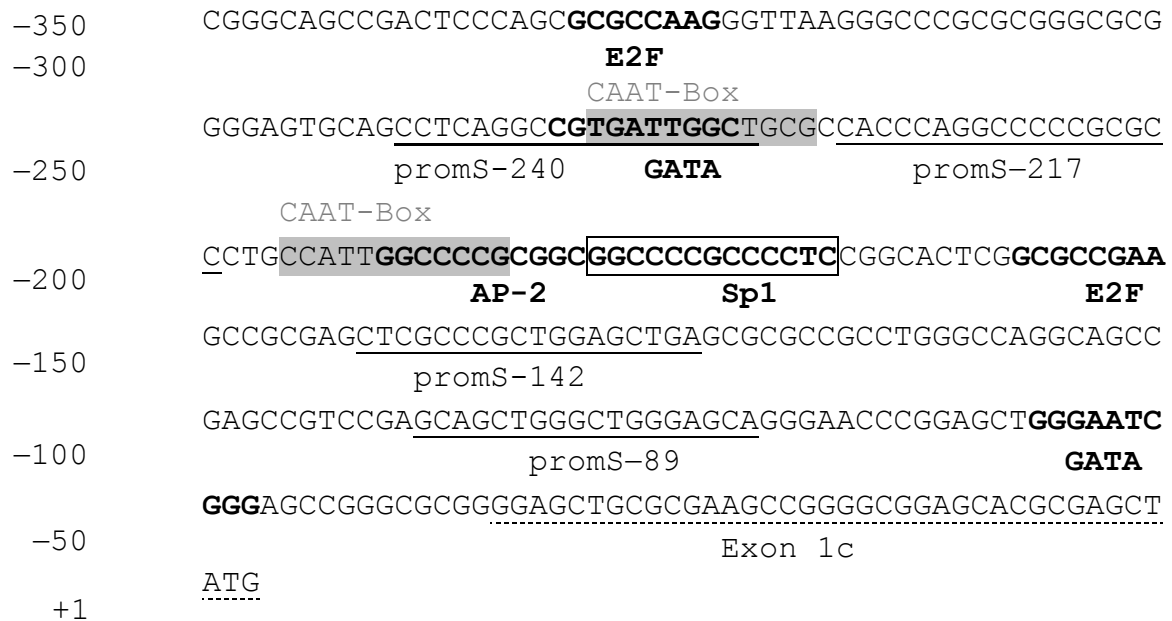
Danach konnte mittels genomischer PCR mit humaner genomischer DNA als Matrize ein Fragment hergestellt werden, das 968 bp aufwärts vom c-spezifischen Translationsstartkodon lokalisiert war. Dieses wurde in den Luziferasereportervektor pGL3basic subkloniert. Die Sequenzierung ergab die in **Abb. 8** dargestellte Basensequenz im 5' Bereich des Exons 1c, welches mit einer punktierten Linie gekennzeichnet ist und ein ATG als möglichen Translationsstartpunkt enthält.

In der Abbildung sind bereits die Konsensussequenzen für die mögliche Bindung regulatorischer Transkriptionsfaktoren und die Lokalisation der Primer für die nachfolgende Herstellung der Deletionsmutanten eingezeichnet, auf die unter **6.2** näher eingegangen werden soll.

```

09876543210987654321098765432109876543210987654321
-968                                     GTTGTCCTGAAGTCCCTG
                                           promS-968
-950 GACGGCAACGAATCCCAAATAAATCAGTCAGGGCTTTCCTTCACATATAA
                                           AP-1
-900 ACACACGGGCACGCGGAATCCACCCCTCCCCACTTTCTGTCTCCTCATC
                                           promS-885      Sp1                GATA
-850 TCTCTTCCTCTCTTACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
                                           CA-Mikrosatellit
-800 ACACGGCAACAAACCCCAAATATACCGGACACACACACACAGCAACAAAC
                                           Ets-1
-750 CTCAACTACAGCGGACACACACACAGCAACGAACCCCATATATAGCAAAC
                                           promS-739
-700 ACACACACGCACATATACACACAGCGCAACAAATCCCAAATATAGTCAGG
-650 ACTTTCCTTCACACATAAGCACACGGGCACGCGGAATCCACCCCTCCCAC
-600 CGTTTCTGTCTCCTATTCTCCTCCCTCTTACACACACGCGCGCGCGCGCG
                                           CG-Mikro-
-550 CGCGCGCGCACACACACACACACACACACACACACACACACAGCAGC
                                           satellit          CA-Mikrosatellit
-500 TGCAGCGCCCCGGGTCACTCCAGTGCAGGAGCCAGGCAGGAGACAAAG
                                           promS-490
-450 GTCGCCGAGGCTCCCGGCGGCCCCACCGGACACAATCGAGCTTCTTCCCG
                                           Ets-1      GATA      promS-409
-400 GTTCTGCTAGCTCCCAACGCCGGTCTCGGCAAGGTCTGGACCCTGCGCCC
CGAAGCAACAACCTCCCGCCTGCTCCTGCCCTCCAGGTTCCCCGCGCAGCC

```



**Abb. 8:** Genomische Sequenz der 5'-UTR von ECE-1c. Konsensussequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren und Primerbindungsstellen für die Herstellung der Deletionsmutanten sind eingetragen. Einfache Unterstreichung: Primerbindungsstelle; Fettgedrucktes und Rahmen: Konsensussequenz; grauer Kasten: CAAT-Box; blaue Schrift: CA-Mikrosatellit; graue Schrift: CG-Mikrosatellit; gepunktete Unterstreichung: Exon 1c

## 6.2 Promotoranalyse

### 6.2.1 Bioinformatische Promotoranalyse

Die Analyse der Sequenz des -968 Basenfragments in Bezug auf potentielle *cis*-Elemente, die an der Regulation des Promotors beteiligt sein könnten, erfolgte mit Hilfe der Datenbank TRANSFAC, Version 3.5, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig (Heinemeyer et al., 1999). Das Ergebnis ist in **Tabelle 3** aufgelistet, die Positionen der Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren sind in **Abb. 8** verzeichnet.

Konsensussequenz für	Position im Promotor relativ zu ATG	Sequenz im ECE-1c Promotor (5' - 3')	Transkriptionsfaktor
GATA	-57 bis -48 -232 bis -223 -420 bis -411 -857 bis -849	-GGGAATCGGG- -CACAATCGAG-* -CACAATCGAG-* -CCTCATCTC-*	GATA-1 bis -6 GATA-1 bis -6 GATA-1 bis -6 GATA-1 bis -6
E2F	-158 bis -151 -281 bis -274	-GCGCCGAA-* -GCGCCAAG-*	E2F1-6 E2F1-6
Sp1	-180 bis -168 -880 bis -868	-GGCCCCGCCCCTC-* -CACCCCTCCCCCA-*	Sp1 Sp1
CAAT-Box	-196 bis -185 -220 bis -209	-CCATTGGCCCCG-* -TGATTGGCTGCG-*	C/EBP, CTF/NF-I, CDP, NF-Y u.a.
AP-2	-191 bis -181	-GGCCCCGCGGC-	AP-2
Ets-1	-426 bis -417 -777 bis -768	-ACCGGACACA- -ACCGGACACA-	Ets-1 Ets-1
AP-1	-928 bis -919	-AATCAGTCAGG-	AP-1

**Tab. 3:** Mögliche *cis*-Elemente im humanen ECE-1c Promotor; \*: Sequenz auf dem komplementären Strang, Unterstreichung: Kernkonsensussequenz

### 6.2.2 Funktionelle Promotoranalyse

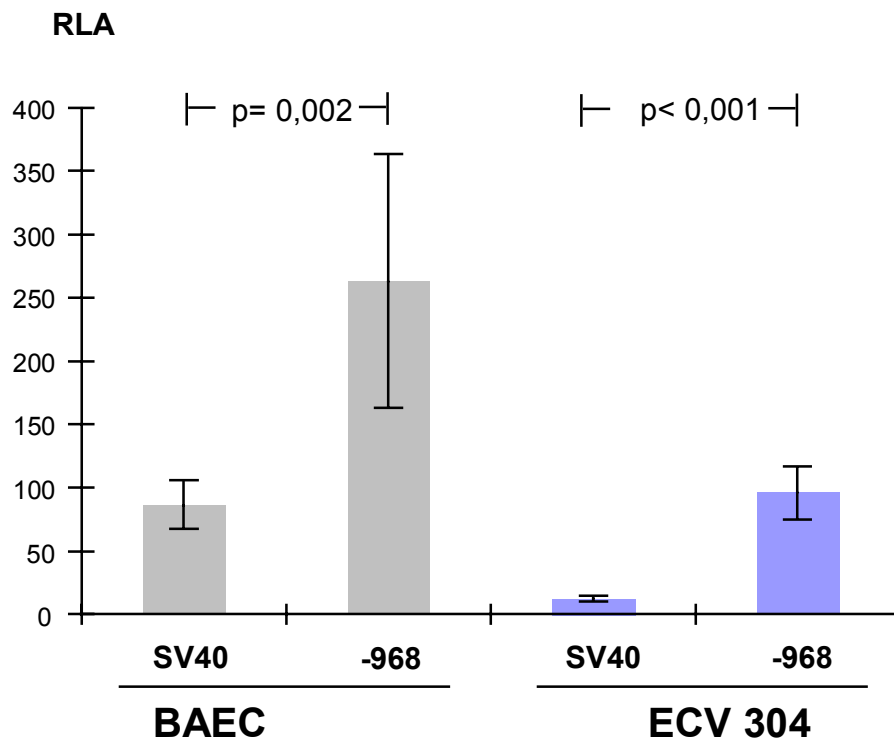
Durch Transfektion von primär kultivierten BAEC und der humanen Zelllinie ECV304 mit dem Vollkonstrukt –968 wurde die 5' Region von Exon ECE-1c auf Promotorfunktion hin überprüft. Um die relative Stärke der ECE-1c Promotoraktivität einordnen zu können, wurde ein durch den starken viralen SV40 Promotor angetriebenes pGL3-Plasmid jeweils als Positivkontrolle verwendet (**Abb. 9**). Die relative Luziferaseaktivität (RLA) ist dabei folgendermaßen definiert:

$$RLA = \text{Luc}_{(\text{Konstrukt})/\text{Gal}} / \text{Luc}_{(\text{pGL3basic})/\text{Gal}}$$

Eine RLA von beispielsweise 60 bedeutet damit, daß das Konstrukt die Genexpression der Luziferase gegenüber dem pGL3basic-Reporterplasmid um den Faktor 60 erhöht. Die Fehlerbalken in den folgenden Diagrammen kennzeichnen das Produkt aus Variationskoeffizient und relativer Luziferaseaktivität, wobei der Variationskoeffizient als Quotient von Standardabweichung und Mittelwert definiert ist. Der Mittelwert ergibt sich jeweils aus  $n = 6$  Transfektionsansätzen pro untersuchtem Konstrukt.

Der ECE-1c Promotor zeigte gegenüber dem viralen SV40 Promotor eine 3-fach höhere Aktivität in BAEC und eine um den Faktor 7,7 gesteigerte Aktivität in ECV304-Zellen. Zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten galt ECV304 - wie bereits unter **5.3.2** dargestellt - als von HUVEC abgeleitete, immortalisierte humane Endothelzelllinie (Takahashi et al., 1990) und wurde untersucht, um im Vergleich mit BAEC mögliche speziesabhängige Unterschiede in der Promotoraktivität aufdecken zu können. Heute muß die Zuordnung von ECV304 als Endothelzelllinie revidiert werden, da die Zellen eine genetische Übereinstimmung mit der Blasenkarzinomzelllinie T24/83 aufweisen und damit höchstwahrscheinlich einen epithelialen Zelltyp darstellen (Brown et al., 2000; Suda et al., 2001). Die insgesamt höhere RLA für das ECE-1c Promotorkonstrukt –968 in BAEC gegenüber ECV304 kann daher sowohl durch speziesabhängige als auch zelltypspezifische Unterschiede

in der Promotoraktivität bedingt sein. Auf den Einfluß des Zelltyps für die ECE-1c Promotoraktivität wird im weiteren Textverlauf unter **6.2.3** noch einmal gesondert eingegangen. Der zweiseitige Student's *t*-Test für unverbundene Stichproben zeigte für die Reporterogenaktivität in BAEC (SV40/-968) ein Signifikanzniveau von  $p=0,002$  und in ECV304 (SV40/-968) von  $p<0,001$  (**Abb. 9**).



**Abb. 9:** Promotoraktivität des ECE-1c Reportergenvollkonstruktes -968. Bestimmt wurde die RLA in BAEC und ECV304. Der starke virale Promotor SV40 diente als Referenz.

Auf der Grundlage der Sequenzanalyse auf mögliche *cis*-Elemente wurden serielle Deletionsmutanten (5'-Ende bei -89, -142, -240, -490, -739 und -885 relativ zum Translationsstartkodon) durch genomische PCR generiert. Über deren Primerpositionen, sowie Ein- und Ausschluß von Konsensussequenzen gibt **Abb. 8** Auskunft. Im Anschluß erfolgte die Transfektion von BAEC (**Abb. 10**) und ECV304 (**Abb. 11**).

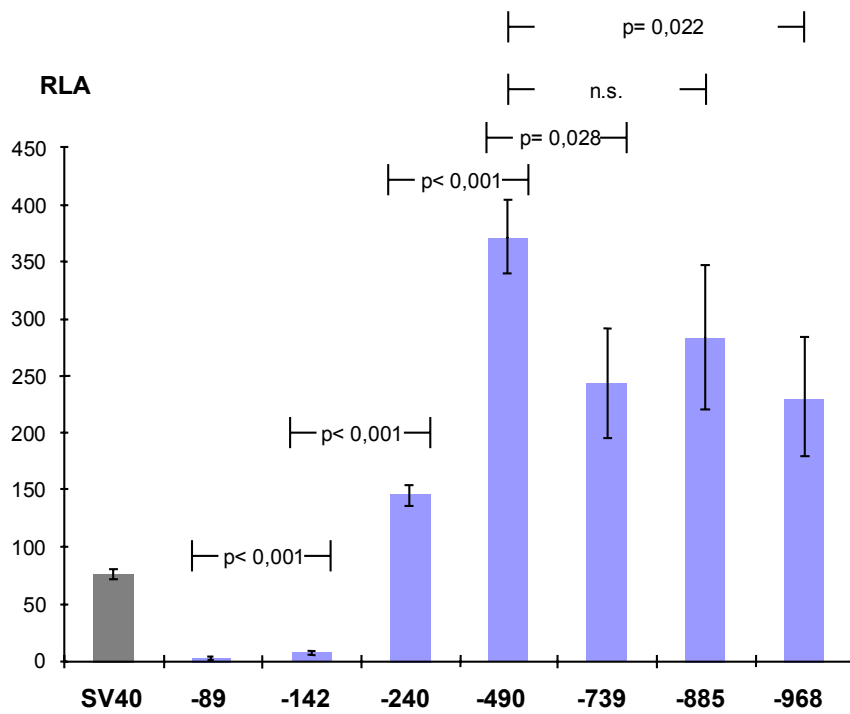


Abb. 10: Promotoraktivität serieller Deletionsmutanten des ECE-1c Vollkonstruktes (-968) in BAEC

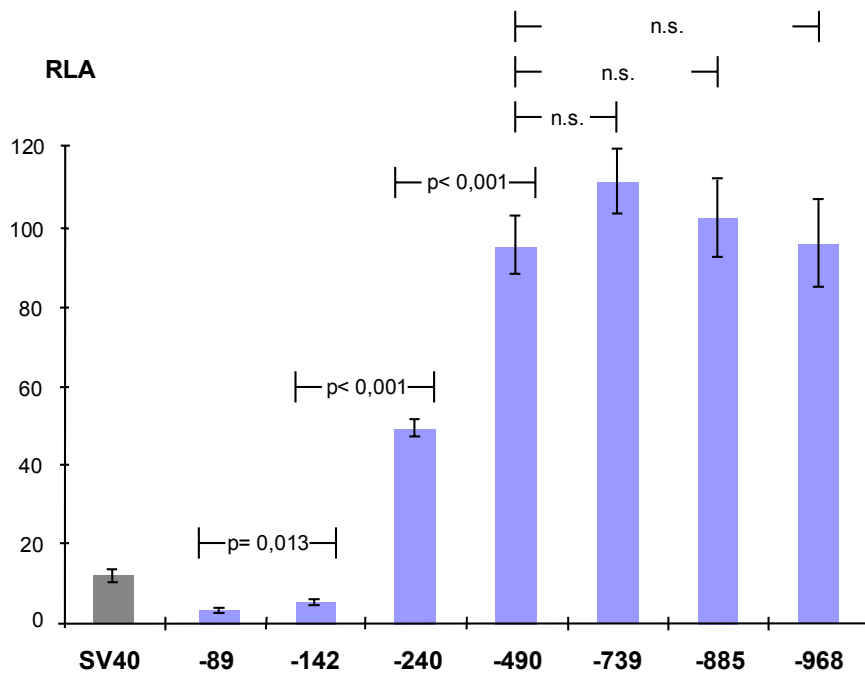


Abb. 11: Promotoraktivität serieller Deletionsmutanten des ECE-1c Vollkonstruktes (-968) in ECV304

Maximale Promotoraktivität wurde bereits durch Transfektion des Konstruktes –490 in BAEC bzw. –739 in ECV304 erreicht. Dabei zeigte das Konstrukt in BAEC eine 372-fache und in ECV304 eine 112-fache Aktivität bezogen auf das pGL3basic-Reporterplasmid und 4,8-fach bzw. 8,9-fach gesteigerte Aktivität gegenüber dem starken viralen SV40 Promotor, welcher als Positivkontrolle ebenfalls transfiziert wurde. In ECV304 sind die Unterschiede der RLA zwischen –490 und –739 mit  $p=0,065$  nicht signifikant. Dies gilt ebenso für die Aktivitätsunterschiede zwischen –739/–885 ( $p=0,234$ ), –885/–968 ( $p=0,448$ ) und –739/–968 ( $p=0,132$ ).

Der Abfall der RLA in den BAEC zwischen den Promotorkonstrukten –490 und –739 ist mit  $p=0,028$  signifikant, jedoch sind die Unterschiede der folgenden Deletionsmutanten (–739/–885,  $p=0,440$ ; –885/–968,  $p=0,327$ ), sowie zwischen –490 und –885 ( $p=0,067$ ) nicht signifikant. Bezüglich des Aktivitätsabfalls gingen wir aufgrund der zusammenfassenden Betrachtung der Signifikanzniveaus nicht davon aus, daß es sich hierbei um einen funktionell bedeutsamen Unterschied handelt. Durch wiederholte Transfektion in BAEC konnte diese Annahme bestätigt werden (Tabelle 4).

Art des Konstruktes	Mittelwert der RLA	Signifikanzniveau p
SV40	33,7	
–240	128,7	$p(\text{SV40}/-240) < 0,001$
–490	223,7	$p(-240/-490) < 0,001$
–739	189,3	$p(-490/-739) = 0,199$

**Tab. 4:** RLA und Signifikanzniveaus bei wiederholter Transfektion der Konstrukte –240, –490 und –739 in BAEC

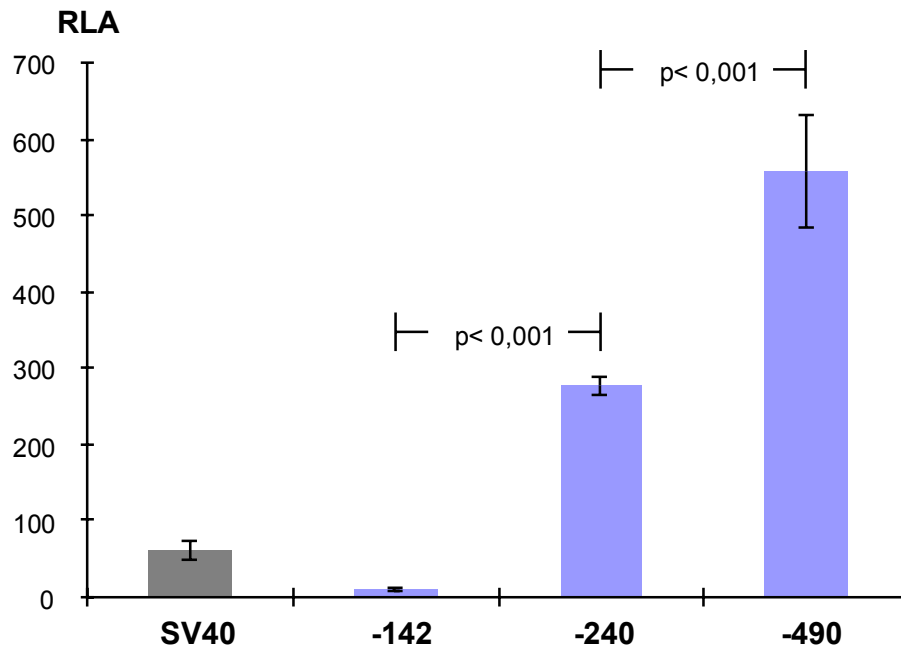


### 6.2.3 Promotoraktivität und Konsensussequenzen

Die zwei kürzesten Konstrukte –89 und –142 ergaben jeweils nur eine schwache RLA von 3,5- und 5,6-facher pGL3basic Aktivität in ECV304 bzw. 3,6- und 9,8-facher RLA in BAEC. Extension des Konstruktes auf –240 resultierte in einem Anstieg der RLA um den Faktor 9 (ECV304) und 17 (BAEC) gegenüber –142 ( $p < 0,001$ ), wobei diese Region Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren E2F, SP1, AP-2 und GATA sowie zwei CAAT-Boxen enthält.

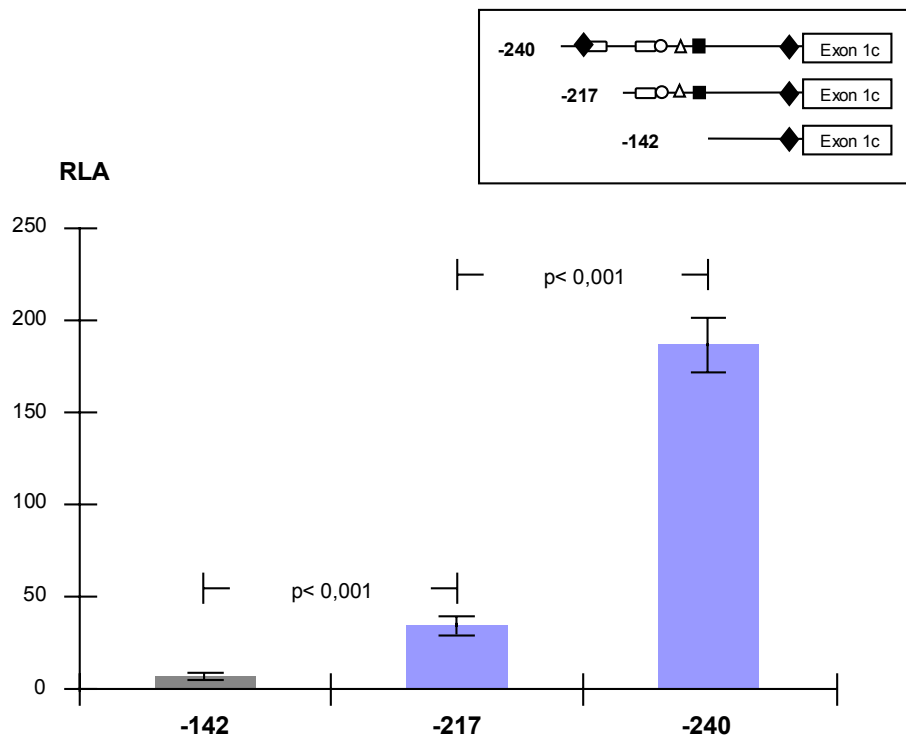
Eine weitere 5'-Verlängerung des ECE-1c Promotors bis Position –490 und damit der Einschluß von Konsensussequenzen für die Bindung von E2F, GATA und Ets-1 hatte eine zusätzliche Aktivitätszunahme um den Faktor 1,9 (ECV304) bzw. 2,5 (BAEC) gegenüber dem Konstrukt –240 zur Folge ( $p < 0,001$ ). Dagegen führten die Konstrukte –739, –885 und –968 zu keiner signifikanten Änderung der Aktivität in Bezug auf das Konstrukt –490.

Hinsichtlich der untersuchten Spezies ist hierbei von Bedeutung, daß die Promotorkonstrukte sowohl in bovinen, als auch humanen Zellen vergleichbare Funktionen zeigten, abgesehen von den in BAEC insgesamt höheren Absolutwerten der RLA. Darüber hinaus verhielt sich die Promotoraktivität hinsichtlich der beiden stärksten Aktivitätszunahmen zwischen den Konstrukten –142 und –240 sowie –240 und –490 im untersuchten endothelialen (BAEC) und epithelialen (ECV304) Zelltyp gleichartig. Um dies für einen weiteren humanen epithelialen Zelltyp zu bestätigen, erfolgte die Transfektion der Promotorkonstrukte –142, –240 und –490 in die Mammakarzinomzelllinie MCF7 (**Abb. 12**). In Analogie zu den Ergebnissen für BAEC und ECV304 zeigte das kürzeste Konstrukt –142 eine schwache RLA. Extension des Konstruktes auf –240 resultierte in einem Anstieg der RLA um den Faktor 28 gegenüber –142 ( $p < 0,001$ ). Eine weitere 5'-Verlängerung bis Position –490 führte auch in diesem Zelltyp zu einer zusätzlichen Aktivitätszunahme um den Faktor 2 gegenüber dem Konstrukt –240 ( $p < 0,001$ ).

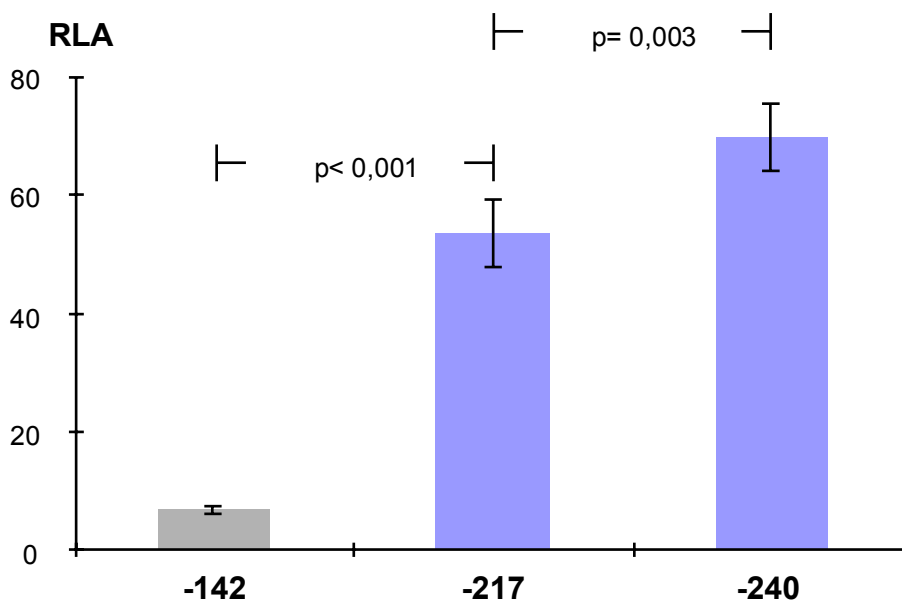


**Abb. 12:** Promotoraktivität der Deletionsmutanten –142, –240 und –490 in MCF7-Zellen

Die Rolle der GATA-Konsensussequenz an Position –226 bzw. der partiell überlappenden CAAT-Box bei –220 wurde mittels Konstruktion und nachfolgender Transfektion der Deletionsmutanten –217 und –240 in MCF7 und ECV304 untersucht. Die Insertion in **Abb. 13** zeigt schematisch die ein- bzw. ausgeschlossenen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren GATA und CAAT-Box bindendes Protein sowie AP-2, E2F und Sp1. Der Ausschluß der Konsensussequenzen für GATA/CAAT-Box bindendes Protein führte zu einer Abnahme der RLA von 187 auf 35 (= –81,5%) in MCF7 (**Abb. 13**) sowie von 70 auf 53 (= –23,7%) in ECV304 (**Abb. 14**). Der Abfall der Promotoraktivität war in beiden Zelltypen zwar signifikant, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die gegenüber dem Konstrukt –142 signifikante Erhöhung der RLA von –217 um den Faktor 6,1 in MCF7 und 7,9 in ECV304 verweist dagegen auf eine mögliche zelltypunabhängige Bedeutung der in diesem Bereich lokalisierten Konsensussequenzen für E2F, Sp1 und AP-2 sowie der CAAT-Box an Position -196.

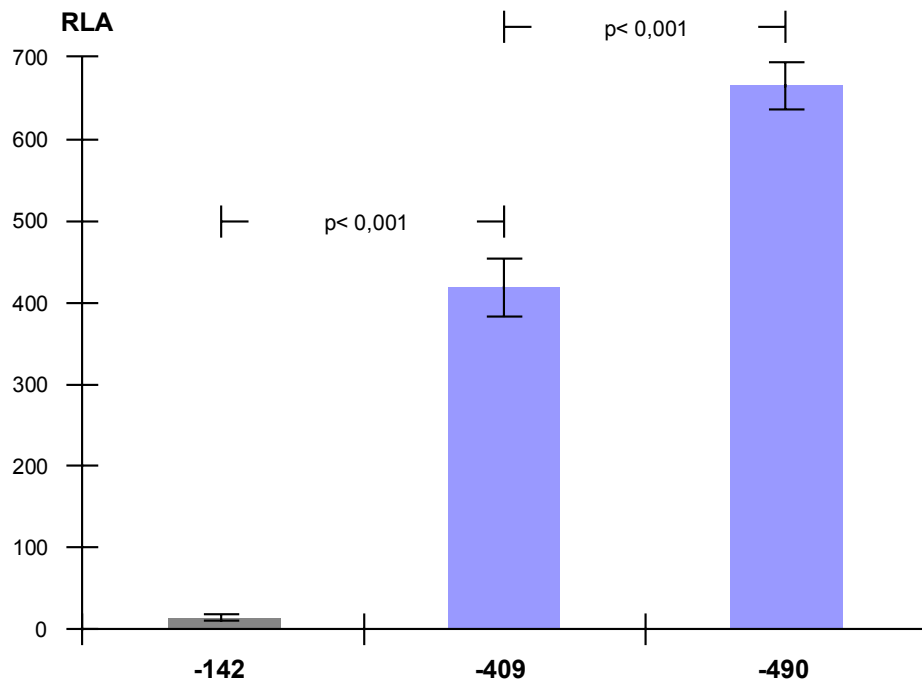


**Abb. 13:** Promotoraktivitäten nach transienter Transfektion von MCF7 mit den ECE-1c Reportergergenkonstrukten -142, -217 und -240; Insertion: Schematische Darstellung der in den transfizierten Reportergergenkonstrukten ein- bzw. ausgeschlossenen Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktorbindung; ◆: GATA, □: CAAT-Box, ○: AP-2, △: Sp1, ■: E2F.



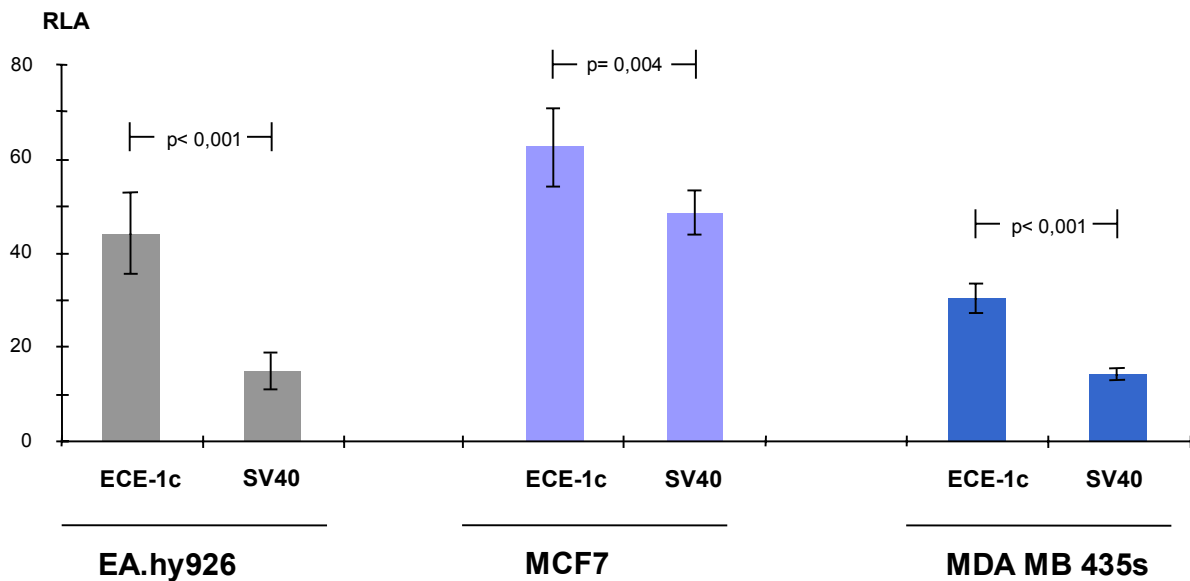
**Abb. 14:** Promotoraktivitäten nach transienter Transfektion von ECV304 mit den ECE-1c Reportergergenkonstrukten -142, -217 und -240

Auf die mögliche Bedeutung des GATA-Elementes bei –420 und des Ets-Elementes bei –426 in MCF7-Zellen deutet das Transfektionsergebnis der Deletionsmutanten –409 und –490 hin: Die Promotoraktivität (RLA) steigt von 419 auf 666 (= +58,9%;  $p < 0,001$ ) (**Abb. 15**).



**Abb. 15:** Promotoraktivitäten nach Transfektion von MCF7 mit den Reportergenkonstrukten –142, –409 und –490

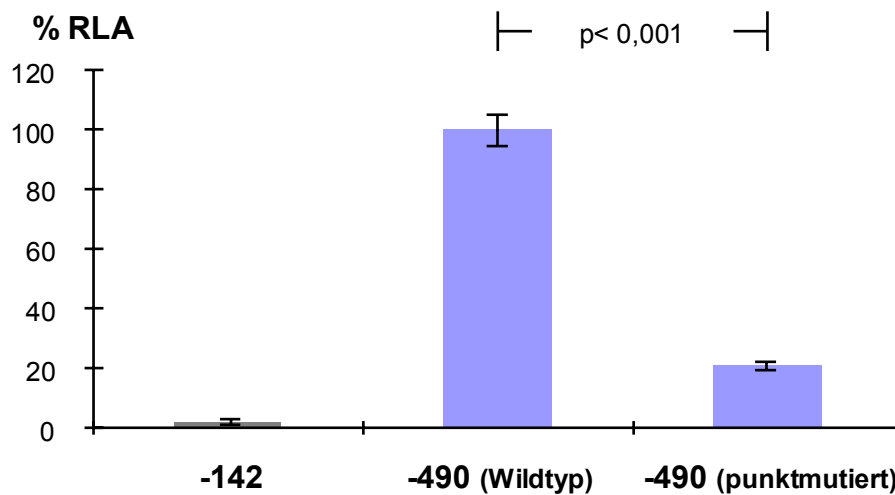
Durch Transfektion der Deletionsmutante –739, die offenbar alle in BAEC wirksamen Promotorelemente enthält, in die humane Endothelzelllinie EA.hy926 und zwei epitheliale Mammakarzinomzelllinien MDA MB 435s und MCF7 konnten wir im Hinblick auf die Stärke des Promotors im Vergleich zum SV40 Promotor keine großen qualitativen zellspezifischen Unterschiede finden, da das Konstrukt unabhängig vom untersuchten Zelltyp starke Reporteraktivität aufwies (**Abb. 16**). Ob die dennoch vorhandenen Unterschiede in der Relation zwischen ECE-1c und SV40 auf einer Variabilität der ECE-1c- oder SV40-Promotorfunktion beruhen, wurde nicht weiter untersucht.



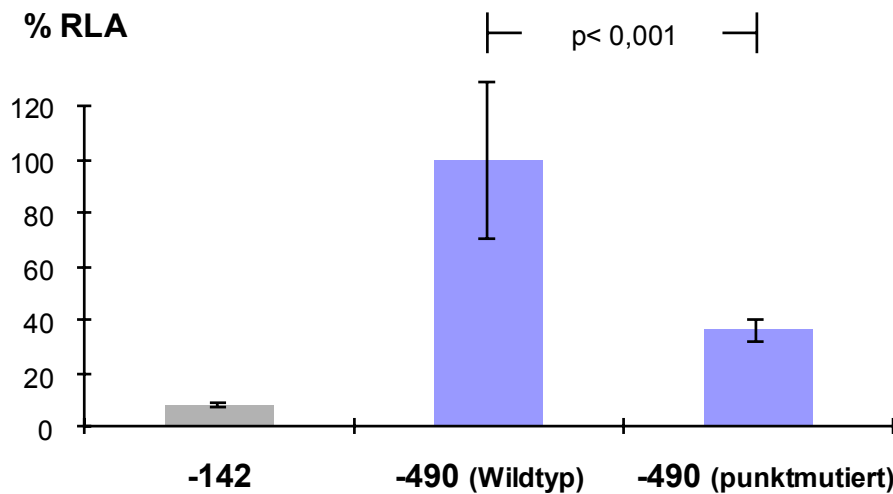
**Abb. 16:** Zellspezifische Aktivität des ECE-1c Promotors nach Transfektion des Konstrukts –739

#### 6.2.4 Funktion der E2F-Konsensussequenz

Da der ECE-1c Promotor keine TATA-Box aufweist, kommt der Konsensussequenz für den Transkriptionsfaktor E2F bei –150 möglicherweise eine Bedeutung als Initiationselement des primären Transkriptionsapparates zu. E2F wurde u.a. als essentieller Faktor für die Aktivierung der Transkriptionsinitiation der Gene für Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase sowie Cyclin A und E beschrieben (Means und Farnham, 1990; Javahery et al., 1994; Sladek, 1997). Daher wurde im Konstrukt –490 an Position –154 mittels Punktmutation die Kernkonsensussequenz für E2F verändert und das mutierte Konstrukt im Anschluß in MCF7 und ECV304 transfiziert. Die Aktivität des Konstruktes, welches die Punktmutation trug, nahm in MCF7 auf 21% (**Abb. 17**) und in ECV304 auf 36% (**Abb. 18**) der Wildtyp-Sequenz –490 ab. Damit konnte die Hypothese der zentralen Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Regulation des TATA-losen ECE-1c Promotors bestätigt werden.



**Abb. 17:** Promotoraktivität nach Transfektion von MCF7 mit den Konstrukten -142, -490 (Wildtyp) und -490 (punktmutiert), welches an Position -154 im Kern der Konsensussequenz für E2F eine Punktmutation trägt. Die RLA des Wildtyp -490 Konstruktes wurde als 100% gesetzt.



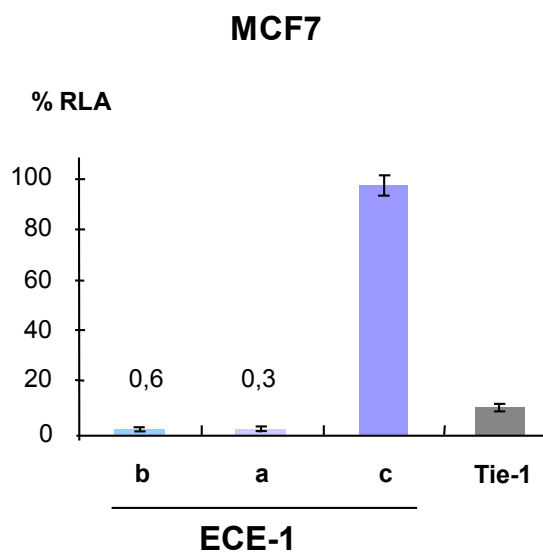
**Abb. 18:** Promotoraktivität nach Transfektion von ECV304 mit den Konstrukten -142, -490 (Wildtyp) und -490 (punktmutiert), welches an Position -154 im Kern der Konsensussequenz für E2F eine Punktmutation trägt. Die RLA des Wildtyp -490 Konstruktes wurde als 100% gesetzt.

### 6.2.5 Vergleich der isoformspezifischen Promotoraktivitäten

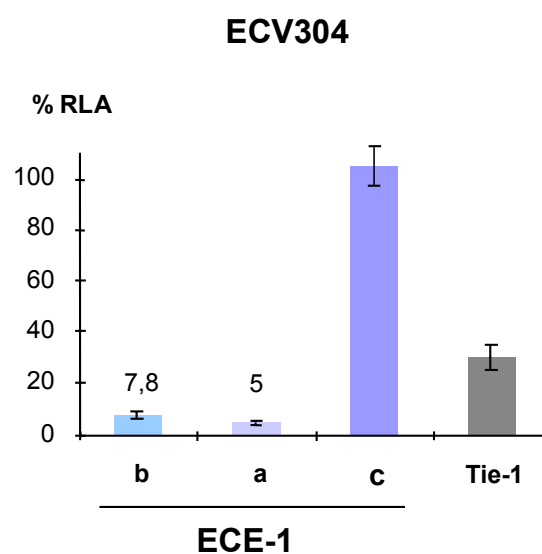
Um die ECE-1c Promotoraktivität mit den bereits charakterisierten ECE-1a und ECE-1b Promotoren (Orzechowski et al., 1997; Orzechowski et al., 1998) zu vergleichen,

wurden die isoformspezifischen Promotoraktivitäten in verschiedenen Zelltypen untersucht (**Abb. 19, Abb. 20**).

In der Mammakarzinomzelllinie MCF7 zeigten die Konstrukte des humanen ECE-1a (-1206/pGL3basic) und ECE-1b Promotors (-1278/pGL3basic) lediglich vernachlässigbare Aktivität im Vergleich zu dem Konstrukt -490 des ECE-1c Promotors. Dagegen waren die ECE-1a und -1b Promotoren in der humanen Endothelzelllinie ECV304 aktiv und erreichten 5% bzw. 7,8% der ECE-1c Promotoraktivität. Die Aktivitätsdifferenz zwischen ECE-1a und ECE-1b war dabei signifikant ( $p < 0,01$ ). Darüber hinaus wurden beide Zelltypen mit einem Tie-1 Promotorkonstrukt der Maus transfiziert, um die ECE-1c Promotoraktivität mit einem gut charakterisierten eukaryotischen Promotor zu vergleichen. Die Expression der Tyrosinkinase Tie-1 ist ursprünglich als spezifisch für Endothelzellen und hämatopoietische Zellen beschrieben worden, Tie-1 wird jedoch auch in humanen Melanomzellen und Adenokarzinomgewebe des Magens exprimiert (Hendrix et al., 2001; Lin et al., 2000; Korhonen et al., 1995). Der Tie-1 Promotor zeigte gegenüber dem ECE-1c Promotorkonstrukt -490 eine Aktivität von 11,8% in MCF7 und 29,2% in ECV304.



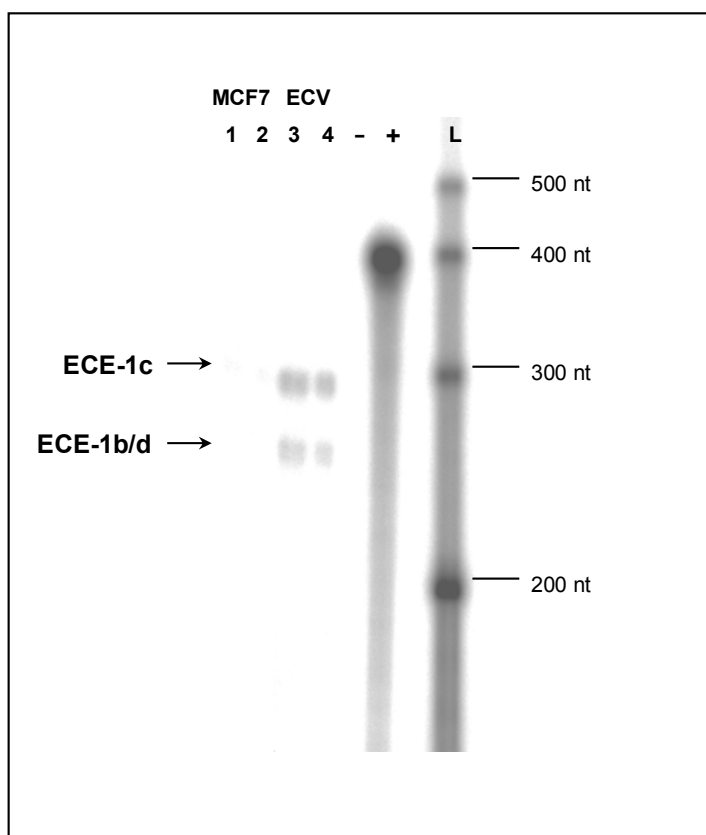
**Abb. 19:**  
Tie-1 und ECE-1 isoformspezifische Promotoraktivität in MCF7; RLA in % im Vergleich zu ECE-1c



**Abb. 20:**  
Tie-1 und ECE-1 isoformspezifische Promotoraktivität in ECV304; RLA in % im Vergleich zu ECE-1c

### 6.3 Bestimmung der isoformspezifischen ECE-1 mRNA-Spiegel

Ein Vergleich der unter 6.2.5 dargestellten Transfektionsergebnisse der isoformspezifischen ECE-1 Promotoraktivitäten mit der Höhe der mittels RPA detektierbaren mRNA-Spiegel (**Abb. 21**) zeigte eine Korrelation zwischen Promotoraktivität und Transkriptspiegel der ECE-1 Isoformen in den Zelllinien MCF7 und ECV304. MCF7 exprimierten ECE-1c mRNA (geschütztes Fragment von 302 Nukleotiden); die mRNA von ECE-1a und -1b/d wurde nicht detektiert. Dagegen stellte sich in ECV304 sowohl die mRNA von ECE-1c, als auch von ECE-1b/d (geschütztes Fragment von 264 Nukleotiden) dar. ECE-1a mRNA (geschütztes Fragment von 177 Nukleotiden) war hier ebenfalls nicht zu detektieren. Das relativ starke ECE-1b Signal im RPA im Vergleich zu der b-spezifischen Promotoraktivität läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß das geschützte Fragment nicht nur die mRNA von ECE-1b, sondern auch von ECE-1d repräsentiert.

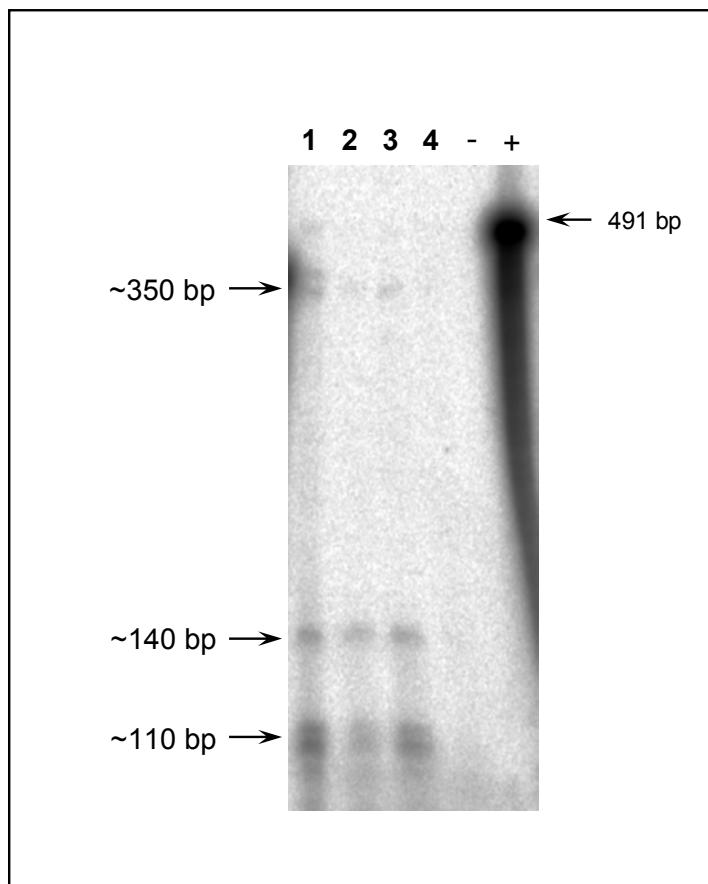


**Abb. 21:** Isoformspezifische ECE-1 mRNA-Spiegel in MCF7- und ECV304-Zellen. Die ECE-1 mRNA wurde mittels RPA detektiert. Eine protektierte Länge von 302 nt entspricht ECE-1c, ECE-1b/d wird durch eine Bande bei 264 nt repräsentiert. ECE-1a ist bei 177 nt zu erwarten. 1 und 2: MCF7 (30 µg RNA); 3 und 4: ECV304 (30 µg RNA); -/+ : Hefe-RNA mit/ohne RNase; L: Größenmarker



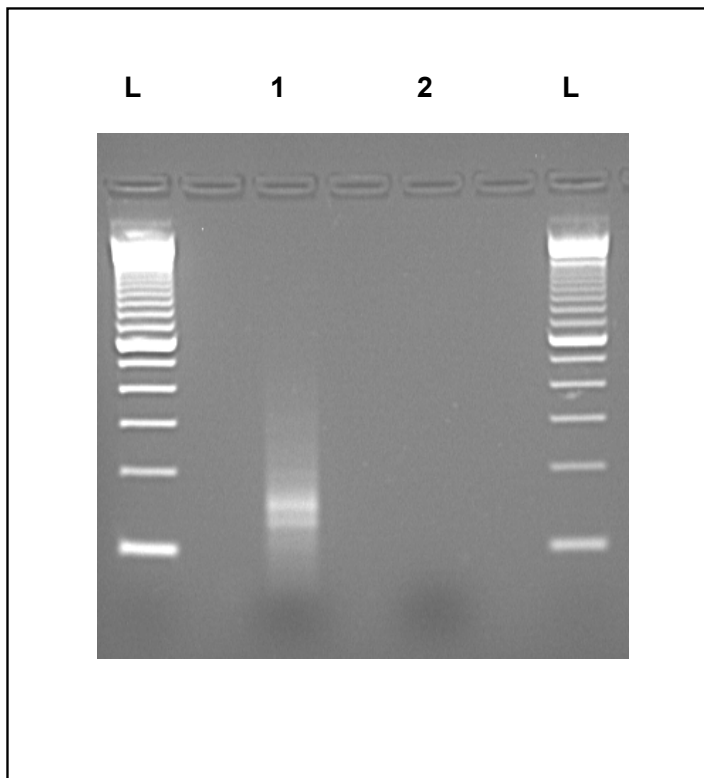
#### 6.4 Analyse der Transkriptionsstartpunkte

Die Transkriptionsstartpunkte der ECE-1c mRNA-Expression wurden durch zwei unabhängige Methoden bestimmt: RPA und 5'-RACE. Für den **RPA** wurde eine auf der genomischen Sequenz basierende antisense-RNA-Sonde mit einer genspezifischen Länge von 394 Nukleotiden benutzt, um die ECE-1c-spezifischen Startpunkte in verschiedenen Zelltypen zu determinieren (**Abb. 22**). Es konnten protektierte Fragmente mit einer Größe von etwa 110 bp als Doppelbande, 140 bp und - mit geringerer Signalintensität - 350 bp detektiert werden, was Transkriptionsstartpunkten an den Positionen -110, -140 und -350 relativ zum ATG in Exon 1c entspricht. Anhand der Signalintensitäten kann man von Hauptstartpunkten bei -110 (Doppelbande) und -140 sowie einem Nebenstartpunkt bei -350 ausgehen.



**Abb. 22:** Analyse der Transkriptionsstartpunkte mittels RPA; 1: HUVEC (40  $\mu$ g RNA); 2: Calu-6 (40  $\mu$ g RNA); 3: EA.hy926 (40  $\mu$ g RNA); 4: MCF7 (23  $\mu$ g RNA); -/+ : Hefe-RNA mit/ohne RNase

Die **5'-RACE** wurde mit HUVEC cDNA und einem antisense-Primer direkt 5' des fakultativen Startkodons in Exon 1c durchgeführt. **Abb. 23** zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese des RACE-Produktes mit einer Doppelbande bei etwa 130 bp, was transkriptionellen Startpunkten bei etwa 110 bp und somit den RPA-Signalen gleicher Größe entspricht. Die Differenz der Basenpaare ergibt sich dabei nach Abzug des im ersten Schritt der 5'-RACE synthetisch angefügten Poly-G-Ankers. Durch Subklonierung und Sequenzierung des RACE-Produktes wurde die Spezifität des Fragmentes bestätigt und die 5'-Enden an den Positionen –101 und –106 relativ zum Transkriptionsstartpunkt lokalisiert.



**Abb. 23:** Analyse der Transkriptionsstartpunkte in HUVEC mittels 5'-RACE; 1: 5'-RACE, 2: Negativkontrolle, L: 100 bp-Leiter