

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte das c-spezifische Exon des humanen Gens für ECE-1 genomisch lokalisiert, die Startpunkte der Transkription von ECE-1c mRNA lokalisiert und der ECE-1c Promotor kloniert sowie funktionell charakterisiert werden. Das Exon ECE-1c liegt 55 kbp 5' des b-spezifischen Exons und ist damit das am weitesten 5' lokalisierte Exon des humanen ECE-1 Gens.

Der ECE-1c-spezifische Promotor enthält keine TATA-Box und kein Inr-Element, eine zusammen mit dem GC-Reichtum des Promotors typische Konstellation für einen *housekeeping*-Promotor. Durch das Fehlen eindeutiger Kernpromotorelemente verläuft die Transkriptionsinitiation bei TATA⁻Inr⁻-Promotoren häufig unpräzise. Auch im ECE-1c Promotor existieren multiple Transkriptionsstartpunkte, die mittels RPA an den Positionen -110, -140 und -350 bp relativ zum Translationsstartkodon in Exon 1c detektiert werden konnten, wobei die Subklonierung und anschließende Sequenzierung der RACE-Produkte eng benachbarte Startpunkte bei -101 und -106 bp bestätigte. Als mögliche *cis*-Elemente, die anstelle der TATA-Box und eines Inr die basale Transkription der ECE-1c mRNA initiieren und damit den Transkriptionsstart festlegen können, finden sich in dem Sequenzabschnitt zwischen -142 und -240 Konsensussequenzen für E2F (-154), Sp1 (-180) sowie zwei CAAT-Boxen (-196 und -220). Die Transfektionsexperimente in der vorliegenden Arbeit zeigten für diesen Promotorbereich den stärksten Anstieg in der RLA als Ausdruck der Promotoraktivität. Beide CAAT-Boxen im ECE-1c Promotor sind in passendem Abstand zu den ermittelten Transkriptionsstartpunkten bei etwa -110 und -140 lokalisiert. Die Konsensussequenz für E2F bei -154 bp vom Translationsstartkodon in Exon 1c liegt direkt 5' einer der detektierten Transkriptionsstartpunkte bei etwa -140 bp. Die durch Punktmutation dieses *cis*-Elementes nachgewiesene starke Reduktion der Promotoraktivität spricht für die zentrale Bedeutung von E2F bei der basalen Transkriptionsregulation von ECE-1c. Im ECE-1c Promotor liegen die Konsensussequenzen für die Bindung von Sp1 40 bp bzw. 70 bp 5' der Startpunkte bei -140 bzw. -110. GATA und ETS kommen als regulatorische

Transkriptionsfaktoren des ECE-1c Promotors in Betracht. In der distal gelegenen Promotorregion von ECE-1c finden sich zwei CA-Mikrosatelliten an den Positionen –507 bis –542 und –797 bis –836 sowie ein CG-Mikrosatellit zwischen –543 und –564, deren funktionell wirksame Polymorphismen später gezeigt werden konnten. Bedenkt man die Schlüsselrolle von ECE-1 im Rahmen der Endothelinbiosynthese, könnte diesem Promotorpolymorphismus eine pathophysiologische Bedeutung bei der Ausprägung kardiovaskulärer Erkrankungen zukommen.

Der ECE-1c Promotor zeigte im Vergleich zu den ECE-1a, -1b und -1d Promotoren eine deutlich stärkere Reporteraktivität, die sowohl zelltyp-, als auch speziesunabhängig nachgewiesen werden konnte. Die vorliegende Arbeit liefert somit erste Hinweise auf die transkriptionelle Regulation der am stärksten exprimierten ECE-1 Isoform, was zu einem besseren Verständnis der Regulation des Endothelinsystems während der Entwicklung und unter pathophysiologischen Bedingungen beitragen kann.