

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. I. Roots

Mechanismen der Regulation des ECE-1a-Promotors durch ETS-
Transkriptionsfaktoren in kultivierten Endothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Andreas Zimmermann
aus Berlin

Referent: PD Dr. med. H.D. Orzechowski

Koreferent: Prof. Dr. med. N. Hübner

Gedruckt mit Genehmigung der
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 14.10.2008

Gewidmet meiner Mutter
Ursula Hopf-Volker

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Martin Paul, Dekan der Charité und damaliger geschäftsführender Direktor des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Berlin danke ich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen. Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Hans-Dieter Orzechowski möchte ich für die Überlassung des Themas und die vorzügliche, intensive Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft, freundliche Anleitung und konstruktive Kritik, die mich bei der Planung und Durchführung der Experimente begleitet haben, danken. Die vielen Gespräche waren für mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich eine Bereicherung.

Herrn Dr. med. Heiko Funke-Kaiser, Frau Christel Meißner und Frau Brigitta Schwaneberg danke ich für deren Diskussionsbereitschaft und die Hilfestellung bei der Einarbeitung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden sowie für ihre technische Unterstützung. Meinem Bruder, Herrn Joachim Tews, danke ich für die Beratung bei mathematischen Fragestellungen zur statistischen Auswertung. Allen Mitarbeitern und Doktoranden des Labors möchte ich für deren freundliche Art und Kollegialität danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mit Ihrer Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit in dieser Form erst möglich gemacht hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2	Einleitung	13
2.1	Das Endothelinsystem	13
2.1.1	Synthese der Endotheline	13
2.1.2	Expression und Regulierung der Endotheline	14
2.1.3	Endothelin-Rezeptoren	15
2.1.4	Endothelinspezifische Signaltransduktionsmechanismen	15
2.1.5	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems	17
2.2	Das Endothelin-Konversionsenzym	22
2.2.1	Biochemische Struktur, subzelluläre Lokalisation und Enzymkinetik	22
2.2.2	Gewebespezifische Expression von ECE-1, ECE-2, ECE-3 und XCE	24
2.2.3	Bedeutung von ECE-1	24
2.2.4	Gewebespezifische und subzelluläre Verteilung der Isoformen des ECE-1	24
2.2.5	Prinzipien der isoformspezifischen Genexpression	25
2.2.6	Genetische Struktur und spezifische Genregulation der Isoformen des ECE-1	27
2.2.7	Promotorstruktur der ECE-1-Isoformen	28
2.3	Die ETS-Familie der Transkriptionsfaktoren	28
2.3.1	Der Transkriptionsfaktor Ets-1	30
2.3.2	Der Transkriptionsfaktor NERF	33
3	Fragestellung	35
4	Methoden	36
4.1	Computerbasierte Analyse	36
4.2	Zellkultur	36
4.3	Extraktion von nukleärem und zytoplasmatischem Protein aus Zellkultur-Zellen	37
4.3.1	Prinzip	37
4.3.2	Durchführung	37
4.4	Proteinbestimmung	38
4.4.1	Prinzip	38
4.4.2	Durchführung	39
4.5	Gelshift / Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	39
4.5.1	Prinzip	39
4.5.2	Durchführung	40
4.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
4.6.1	Prinzip	43
4.6.2	Durchführung	43
4.7	Einbringen von Punktmutationen	44
4.7.1	Prinzip	44
4.7.2	Durchführung	44
4.8	Klonierung	45
4.8.1	Prinzip	45
4.8.2	Durchführung	45

4.9	Transfektion	48
4.9.1	Prinzip	48
4.9.2	Durchführung	48
4.9.3	Statistik	50
5 Ergebnisse		51
5.1	Computerbasierte Analyse	51
5.2	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	52
5.2.1	Das Ets-1-Konsensusmotiv	52
5.2.2	Das putative ETS-Motiv -347 im humanen ECE-1a Promotor	54
5.2.3	Das ETS-Motiv -226 im humanen ECE-1a Promotor	55
5.2.4	Die ETS-Motive -639 und -659 im humanen ECE-1a Promotor	56
5.2.5	Das ETS-Motiv -787 im humanen ECE-1a Promotor	60
5.2.6	Das ETS-Motiv -816 im humanen ECE-1a Promotor	61
5.2.7	Das ETS-Motiv -972 im humanen ECE-1a Promotor	63
5.2.8	Das ETS-Motiv -602 im bovinen ECE-1a Promotor	64
5.2.9	Das ETS-Motiv -622 im bovinen ECE-1a Promotor	65
5.3	Funktionelle Promotoranalyse	66
5.3.1	Untersuchungen an bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC)	66
5.3.2	Untersuchungen an humanen EA.hy926-Endothelzellen	68
5.3.3	Untersuchungen an humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC)	74
5.3.4	Der ECE-1a Promotor in verschiedenen Zelllinien	78
5.3.5	Die ECE-1a Promotoren in einer Zellart	80
6 Diskussion		82
6.1	Protein-DNA Interaktion von ETS-Proteinen mit dem ODN cEts-1	82
6.2	Protein-DNA Interaktion von ETS-Proteinen mit ETS- Motiven des ECE-1a Promotors	84
6.3	Die ETS-Bindungsstellen des humanen ECE-1a Promotors im Vergleich	85
6.4	Die Regulierung des bovinen ECE-1a Promotors	87
6.5	Die Regulierung des humanen ECE-1a Promotors	88
6.5.1	TPA-Stimulierung / Ets-1 Überexpression und involvierte Signaltransduktionswege	88
6.5.2	Einfluss einzelner ETS-Bindungsstellen im Kontext unterschiedlich langer Promotorkonstrukte	90
6.6	Spezies- und zellspezifische Unterschiede in der Regulation des ECE-1a Promotors	92
6.6.1	Betrachtung der verwendeten Zellarten	92
6.6.2	Das Verhalten des humanen Promotors in verschiedenen Zellarten	93
6.6.3	Das Verhalten des bovinen Promotors in verschiedenen Zellarten	94
6.6.4	Subzelluläre Lokalisation der ECE-1 Isoformen im Kontext der isoformspezifischen Regulierung	94
6.7	Identifizierung des Repressors und mögliche Modelle der De-Repression	95
6.8	Therapeutischer Ausblick	98
7 Zusammenfassung		100

8	Anhang		101
8.1	Literaturverzeichnis		101
8.2	Materialien		110
8.2.1	Oligonukleotide für Gelshifts (EMSA)		110
8.2.2	Lösungen und Puffer		110
8.2.3	Chemikalien		112
8.2.4	Antikörper		113
8.2.5	Vektoren		114
8.2.6	Zellen und Zellkultur		114
8.2.7	Kits		116
8.2.8	Labormaterial		116
8.2.9	Geräte		117
8.3	CURRICULUM VITAE		118
8.4	Publikationen	Fehler! Textmarke nicht definiert.	
8.4.1	Originalarbeiten (Peer-reviewed)		120
8.4.2	Publizierte Abstracts/Kongressbeiträge		120
8.4.3	Kongressbeiträge		120
8.5	Eidesstattliche Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.	

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AML-1	synonyme Bezeichnung „RUNX-1“ (Transkriptionsfaktor)
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivatorprotein-1 (Transkriptionsfaktor)
AP-2	Aktivatorprotein-2 (Transkriptionsfaktor)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AT II	Angiotensin II
b	bovin
BAEC	bovine aortale Endothelzellen („bovine aortic endothelial cells“)
bHLH	„basic-Helix-Loop-Helix“ (Transkriptionsfaktorengruppe)
big ET	„big“ Endothelin
BLAST	„basic local alignment search tool“
BNP	„brain natriuretic peptid“
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
CaMK2	Calcium-Calmodulin-abhängige-Proteinkinase-II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat („cyclic AMP“)
CBF α	„core binding factor alpha“ (Transkriptionsfaktor)
CBF β 2	„core binding factor beta 2“ (Transkriptionsfaktor)
CBP/p300	„cyclic AMP response element-binding protein“ (Transkriptionsfaktor)
cDNA	komplementäre DNA
CEM	T-Zell-Leukämie-Linie
CHO	Eierstockzellen des chinesischen Hamsters („chinese hamster ovary“)

cpm	pro Minute registrierte Ereignisse („counts per minute“)
c-Jun	Bestandteil des AP-1 Komplexes (Transkriptionsfaktor)
DAG	Diazylglycerin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DH5 α	Escherichia coli Zellen
DMEM	„Dulbecco´s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure oder DNS („deoxyribonucleic acid“)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EA.hy926	Hybridzelllinie aus HUVEC und humanen Lungenkarzinomzellen
EAP1/Daxx	„ETS1 Associated Protein 1“ (Transkriptionsfaktor)
EBP	ETS bindendes Protein
ECE	Endothelin-Konversionsenzym („endothelin converting enzyme“)
ECV304	immortalisierte HUVEC
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EMSA	Gelshift („Electrophoretic Mobility Shift Assay“)
Elf-1	„E74-like factor 1“ (Transkriptionsfaktor)
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
ER71	„ETS related 71“ (Transkriptionsfaktor)
ERF	„ETS2 Repressor Factor“ (Transkriptionsfaktor)
ERG	„ETS-related gene“ (Transkriptionsfaktor)
ERM	„Ets Related Molecule“ (Transkriptionsfaktor)
ERK	Extrazellulär signal-regulierte Kinase („extracellular signal-regulated kinase“)
ESE-1/-2/-3	„epithelium-specific Ets“ (Transkriptionsfaktor)
ET	Endothelin
ET _A -Rezeptor	Endothelinrezeptor Typ A
ET _B -Rezeptor	Endothelinrezeptor Typ B
ET _C -Rezeptor	Endothelinrezeptor Typ C
ETS	E26 transformations-spezifisch
FCS	fetales Kälberserum („fetale calf serum“)

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik
Fli-1	„Friend leukemia integration-site 1“ (Transkriptionsfaktor)
G	Guanin
GABP	„GA-binding protein“ (Transkriptionsfaktor)
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein
h	human
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen („human microvascular endothelial cells“)
hnRNA	heteronukleäre RNA
HUVEC	humane umbilikale venöse Endothelzellen („human umbilical vein endothelial cells“)
hZIP	Proteine: „human zink protein“
IP ₃	Inositoltriphosphat-3
IgG	Immunglobulin Typ G
IL-1	Interleukin-1
JNK	„c-Jun NH ₂ -terminal kinase“
kbp	Kilobasenpaare
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	„low density lipoproteins“
M	Molar; Mutante
MafB	AP-1 ähnliches Protein (Transkriptionsfaktor)
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase
MEF	„myeloid elf-1-like factor“(Transkriptionsfaktor)
MEK	eine MAPKK
MM	multipl mutiert
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Botenribonukleinsäure („messenger-ribonucleic acid“)
N	Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren („non essential amino acids“)
NEP	neutrale Endopeptidase
NERF	„new Ets-related factor“(Transkriptionsfaktor)
NF-kappaB	„Nuclear factor kappa B“(Transkriptionsfaktor)

n.s.	nicht signifikant
NYHA	Einteilung der Herzinsuffizienz („New York Heart Association“)
OD	Optische Dichte
ODN	doppelsträngiges Oligonukleotid
P	Phosphorylierung
p38	eine MAP-Kinase
PAA	Polyacrylamid
Pax-5	„paired box protein-5“ (Transkriptionsfaktor)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung („phosphat-buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PDEF	„prostate-derived Ets factor“ (Transkriptionsfaktor)
PE-1	„PU-Ets related-1“ (Transkriptionsfaktor)
PEA3	„polyoma enhancer activator 3“ (Transkriptionsfaktor)
Pfu	eine Titerangabe („plaque forming units“)
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
ppET	präpro ET
PPH	primäre pulmonale Hypertonie
PRL	Prolactin-Promotor der Ratte („prolactin rat promotor“)
PTCA	perkutane transluminale Coronar-Angioplastie
PU.1	„Purine Rich Box-1“ (Transkriptionsfaktor)
R	radioaktive Markierung
Ras	Rat sarcoma
RLA	relative Luciferaseaktivität
nRLA	normalisierte RLA
RNA	Ribonukleinsäure oder RNS („ribonucleic acid“)
RPA	Ribonuklease-Protektionsanalyse
RRE	Ras responsables Element („ras-responsive element“)
RT	Raumtemperatur
RUNX-1	Transkriptionsfaktor: „runt box-1“
SAB	Subarachnoidalblutung
SAP-1	„SRF accessory protein“ (Transkriptionsfaktor)
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase

SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	kleine Kern-RNA („small nuclear RNA“)
SP1	„stimulatory protein 1“ (Transkriptionsfaktor)
Sp100	„stimulatory protein 100“ (Transkriptionsfaktor)
SpiB	„SFFV Proviral Integration Site-B“ (Transkriptionsfaktor)
SpiC	„SFFV Proviral Integration Site-B“ (Transkriptionsfaktor)
T	Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
Tbl	Tablette
TBE	Puffer: „TRIS-Borat-EDTA Puffer“
TBP	„TATA-bindendes Protein“ (Transkriptionsfaktor)
TEL	„translocated ETS leukemia“ (Transkriptionsfaktor)
TEL-2	„translocated ETS leukemia-2“ (Transkriptionsfaktor)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-β	„transforming growth factor-beta“
TLCK	N-p-tosyl-L-Lysine chloromethyl Keton
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tetradecanoylphorbolazetat
TRH	Thyrotropin-„releasing“ Hormon
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Uracil
USF-1	„upstream stimulatory factor 1“ (Transkriptionsfaktor)
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen („vascular smooth muscle cells“)
wt	Wildtyp
XCE	X-Konversionsenzym („x converting enzyme“)
ZNS	zentrales Nervensystem

2 Einleitung

2.1 Das Endothelinsystem

Im Jahre 1988 wurde von Yanagisawa et al. ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid mit vasokonstriktorisches Eigenschaften aus Überständen kultivierter porciner Aortenendothelzellen isoliert, welches „Endothelin“ (ET) genannt wurde (Yanagisawa et al., 1988). Bei diesem Peptid handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um den drei Jahre zuvor von der Gruppe Hickey et al. diskutierten „endothelium-derived constricting factor“, welcher eine Kontraktion der Koronararterien bewirkte (Hickey et al., 1985). Zur Familie der Endotheline gehören die drei Isopeptide ET-1, ET-2 und ET-3 mit einer Länge von 21 Aminosäuren, welche sich nur geringgradig in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Endothelin gehört zu den potentesten Vasokonstriktoren in vivo (Inoue et al., 1989).

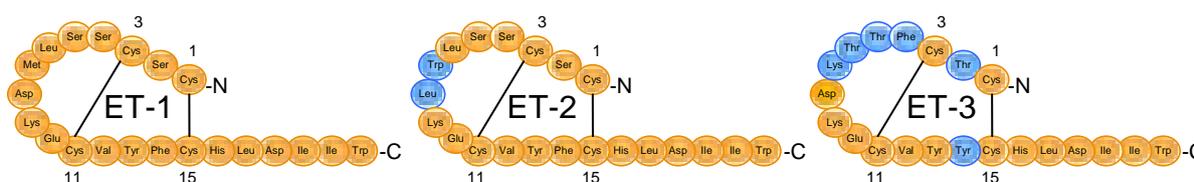


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen der Endotheline-1, -2 und -3 mit Disulfidbrücken und den entsprechenden Positionen. Die Veränderungen der Sequenz in ET-2 und ET-3 sind blau hervorgehoben (modifiziert nach Gianessi et al., 2001)

2.1.1 Synthese der Endotheline

Durch Sondierung einer porcinen cDNA-Bibliothek konnten Yanagisawa et al. ein 203 Aminosäuren langes Vorläuferpeptid (präpro-ET, ppET) identifizieren, innerhalb dessen sich die Sequenz des aktiven Endothelins befindet. Im menschlichen Genom kodieren drei unabhängige Gene auf den Chromosomen 6, 1 und 20 für die Vorläuferproteine ppET-1, ppET-2 und ppET-3 (Inoue et al., 1989). Von Yanagisawa et al. wurde erstmalig der Syntheseweg von ppET über ein weiteres Vorläuferpeptid dem „big-Endothelin“ (big ET) zum aktiven Endothelin postuliert. Für das wesentliche Synthesenzym wurde der Name „Endothelin-converting-enzyme“ vorgeschlagen. Nachdem nicht viel später über die Klonierung des humanen ppET durch die Arbeitsgruppe Itoh et al. (Itoh et al., 1988) berichtet wurde, wurde 1995 die Spaltung von ppET zu big ET vor allem durch unspezifische Endoproteasen wie Furin bestätigt (Denault et al., 1995). Der letzte und entscheidende Schritt in der Synthese erfolgt durch Spaltung des big ET zur aktiven Stufe Endothelin durch das Endothelin-

converting-enzyme (Xu et al., 1994; Turner et al., 1996). Dabei setzen ECE-1 und ECE-2 das Vorläuferprotein big ET-1 im Verhältnis zu big ET-2 und big ET-3 bevorzugt und schneller um (Shimada et al., 1994). ECE-3 konvertiert spezifisch big ET-3 (Hasegawa et al., 1998). ET-1 ist 140fach stärker vasokonstriktorisch als big ET-1 (Kimura et al., 1989). Ein etwas längeres ET-1 wird durch die Chymase generiert (Kido et al., 1998).

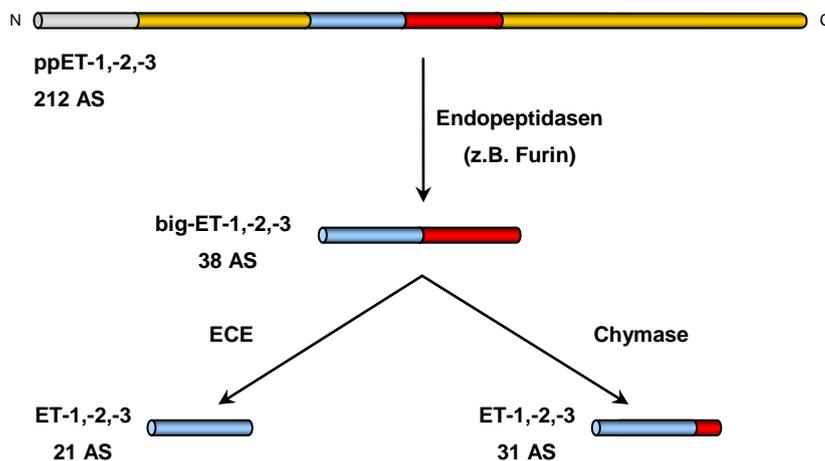


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Endothelin Biosynthese. ppET= Präproendothelin, big-ET= big-Endothelin, ECE= Endothelin Converting Enzyme, ET= Endothelin (Anlehnung an Kähler et al., 1997)

2.1.2 Expression und Regulierung der Endotheline

Die verschiedenen Endothelinisoformen folgen einem spezie- und gewebespezifischen Expressionsmuster.

Endothelin-1

ET-1 zeigt in menschlichem Gewebe das breiteste Expressionsmuster mit Nachweis in Herz, Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Uterus, Plazenta, Mamma, Testis und ZNS. Auf zellulärer Ebene wurde ET-1 u.a. in Endothelzellen, Kardiomyozyten, Alveolarepithel, glomerulären Mesangialzellen, Makrophagen, Fibroblasten sowie neuronalen Zellen nachgewiesen (Rubanyi et al., 1994; Kedzierski et al., 2001). Im Blutplasma liegt ET-1 nur in sehr geringen pikomolaren Konzentrationen vor (Battistini et al., 1993). Mindestens 75% der Endotheline werden von Endothelzellen abluminal freigesetzt, was auf einen parakrinen Mechanismus hindeutet (Eguchi et al., 1995). Die Modulation der Transkription bestimmt die Regulation von ET-1 (Rubanyi et al., 1994). Stimuli für eine ET-1 Sekretion sind u.a. Adrenalin, Angiotensin II (AT-II), Vasopressin, Insulin, Cortisol, Hypoxie, Schubspannung, Interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor-beta (TGF- β), Endotoxin, oxidiertes LDL („low density lipoprotein“), Glukose und Thrombin (Hochoer

et al., 1997; La et al., 1995; Boulanger et al., 1992; Attinà et al., 2005). Inhibierend auf die Expression wirken atriales natriuretisches Peptid (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), Stickoxidyl (NO), Heparin, sowie Nitrovasodilatoren (La et al., 1995; Attinà et al., 2005). In der ersten Lungenpassage wird ET-1 bereits zu über 50% von der Neutralen Endopeptidase (NEP) abgebaut (Abassi et al., 1992).

Endothelin-2

ET-2 befindet sich bevorzugt im Dünndarm und Colon sowie in geringerer Konzentration in Herz und Magen und im Skelettmuskel (Firth et al., 1992). Exprimiert wird es in intestinalen, epithelialen Zellen (Kedzierski et al., 2001).

Endothelin-3

ET-3 wurde in Endometrium, Herz, Lunge, Leber, Magen, Niere, Plazenta, Skelettmuskel und im ZNS nachgewiesen. Exprimiert wird es in neuronalen Zellen, renalen Tubuluszellen und Epithelzellen des Intestinums (Rubanyi et al., 1994; Firth et al., 1992; Matsumoto et al., 1989).

2.1.3 Endothelin-Rezeptoren

Endotheline entfalten ihre Wirkung über verschiedene Endothelinrezeptoren und Second-messenger-Systeme. Die humane Sequenz des ET_A-Rezeptors wurde 1992 von Hosoda et al. und die des ET_B-Rezeptors 1993 von Arai et al. charakterisiert (Hosoda et al., 1992; Arai et al., 1993). Der dritte Rezeptorsubtyp (ET_C) wurde bisher nur in Amphibien kloniert (La et al., 1995). Der ET_A-Rezeptor zeigt eine Affinität zu ET-1 > ET2 >> ET3, während der ET_B-Rezeptor eine ungefähr gleiche Bindung zu den Endothelinen aufweist (Sakurai et al., 1990). Die unterschiedliche Häufigkeit und Relation der Rezeptorsubtypen bestimmen die zell- und gewebespezifische Regulation des ET-Systems. Während in verschiedenen Gefäßen (Aorta, Koronarien, Pulmonalarterien u.a.) ein deutliches Überwiegen des ET_A-Rezeptors vorliegt, wird im Reizleitungssystem des Herzens proportional ein erhöhter Anteil an ET_B-Rezeptoren gefunden (Molenaar et al., 1993; Davenport et al., 1995).

2.1.4 Endothelinspezifische Signaltransduktionsmechanismen

Endothelinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Ohlstein et al., 1992).

ET_A-Rezeptor

Der ET_A-Rezeptor wird vor allem konstitutiv auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert (VSMC), aber auch auf glatten Muskelzellen der Bronchien, auf Hepatozyten, Kardiomyozyten und Neuronen (Kedzierski et al., 2001; Hori et al., 1992). Dabei erfolgt eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch G-Proteine mit anschließender Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) aus Phosphatidyl-inositol-bisphosphat (PIP₂) (Pollock et al., 1995). DAG führt zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle und konsekutivem intrazellulären Kalziumanstieg. IP₃ setzt Kalzium aus intrazellulären Speichern frei. Durch Bildung eines Kalzium-Calmodulin-Komplexes wird schließlich die Myosinleichtkettenkinase aktiviert, die letztendlich die Kontraktion einleitet. DAG vermittelt außerdem über die Aktivierung der Phosphokinase C (PKC) mitogene Effekte (Ohlstein et al., 1992). Der genaue Weg der durch die PKC vermittelten Effekte wird abschließend diskutiert.

ET_B-Rezeptor

Der ET_B-Rezeptor befindet sich auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten, Kardiomyozyten, epithelialen Zellen des renalen Sammelrohres sowie neuronalen Zellen (Kedzierski et al., 2001). An Endothelzellen führt der ET_B-Rezeptor über eine gesteigerte Synthese von NO und Prostazyklin zu einer Vasodilatation, an glatten Muskelzellen zu einer Vasokonstriktion (Hirata et al., 1993).

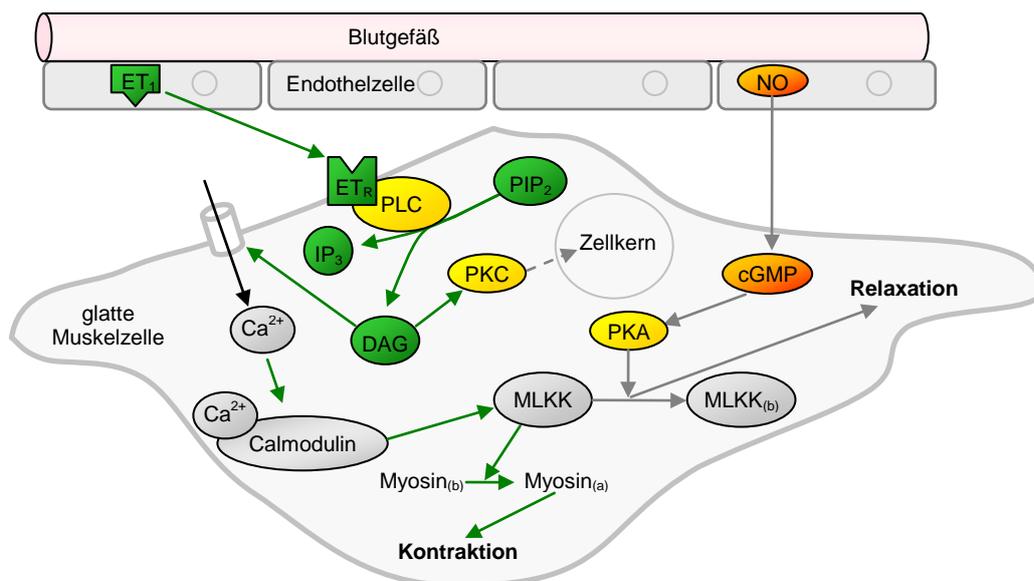


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Teilen des Signaltransduktionsweges von Endothelin-1. ET₁= Endothelin-1, ET_R= Endothelinrezeptor, PLC= Phospholipase C, PIP₂= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, DAG= Diacylglycerin, IP₃= Inositoltriphosphat-3, cGMP= zyklisches Guaninmonophosphat, PKC= Phosphokinase C, PKA= Phosphokinase A, MLKK= Myosinleichtkettenkinase

2.1.5 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Endothelinsystems

Die drei Endothelin Isoformen wirken alle ähnlich auf das Gefäßsystem. Initial kommt es zu einer transienten, durch ET_B -Rezeptoren vermittelten Vasodilatation, gefolgt von einer lang anhaltenden, durch ET_A -Rezeptoren vermittelten Vasokonstriktion. Die initiale Vasodilatation (siehe Abb. 3) wird hauptsächlich durch NO vermittelt. Dies deutete schon früh daraufhin, dass den Endothelinen bei der Blutdruckregulation verschiedener Hypertonieformen eine wichtige Rolle zukommt (Hochoer et al., 1997). Die Endotheline zeigen zellspezifisch unterschiedliche Wirkungen, die sie über Endothelinrezeptoren vermitteln (s.o.).

ET-1 vermittelt u.a. bei Thrombozyten eine erhöhte Aggregationsbereitschaft (Luscher et al., 2000). Die Adhäsionsbereitschaft von humanen neutrophilen Granulozyten wird über Endothelin-1 induziert. Dabei wird eine über ET_A -Rezeptoren vermittelte Aktivierung von Ras hervorgerufen. Daraufhin finden Phosphorylierungen der MAP-Kinase ERK1/2 und des Transkriptionsfaktors Raf-1 statt. Die neutrophile Adhäsion konnte durch *PD98059*, ein Inhibitor der MAPK/ERK Kinase, wieder abgeschwächt werden. Dies deutet daraufhin, dass Endotheline in proinflammatorischen Mechanismen eine bedeutende Rolle spielen (Jozsef et al., 2002). Es stimuliert die Produktion von Zytokinen, wirkt chemotaktisch auf zirkulierende Monozyten und aktiviert Makrophagen (Haller et al., 1991). An glatten Gefäßmuskelzellen wird über ET-1 eine Vasokonstriktion, Migration und Proliferation vermittelt (Luscher et al., 2000). Der Effekt der erhöhten Kollagenproduktion in Fibroblasten der Haut bei Patienten mit Sklerodermie scheint über ET_A - und ET_B -Rezeptoren vermittelt zu werden, während dies bei kardialen Fibroblasten der *mRen2*-transgenen Ratten nur über ET_B -Rezeptoren vermittelt zu sein scheint (Shiwen et al., 2000; Seccia et al., 2003). Nanomolare Konzentrationen von ET-1 haben an Kardiomyozyten von männlichen Schweinen einen positiv inotropen und chronotropen Effekt und können sowohl über ET_A -Rezeptoren als auch über ET_B -Rezeptoren eine Hypertrophie induzieren, wodurch eine Rolle von ET-1 in *Remodeling*-Mechanismen impliziert werden kann (Ishikawa et al., 1988a; Ishikawa et al., 1988b). Die Inotropie kann lediglich durch den selektiven ET_A -Rezeptorantagonisten *BQ-123*, aber nicht durch den selektiven ET_B -Rezeptorantagonisten *BQ-788* aufgehoben werden. Dies lässt vermuten, dass die Steigerung der Inotropie nur durch ET_A -Rezeptoren vermittelt ist (Burell et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe Zhu et al. konnte zeigen, dass ET-1 über eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration in kultivierten Kardiomyozyten der Ratte eine Hypertrophie induziert. Dabei wird über einen Calmodulin und Calcineurin abhängigen Weg der Transkriptionsfaktor NFAT phosphoryliert und nachfolgend schließlich der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert. Dieser fördert Wachstumsfaktoren und aktiviert Gene, die in die Myokardhypertrophie mit einbezogen sind (Zhu et al., 2000; Yang et al., 2005). Untersuchungen an adrenalen, kortikalen Zellen der Ratte haben ergeben, dass die Aldosteronproduktion über ET_B -Rezeptoren stimuliert wird (Belloni et al., 1996).

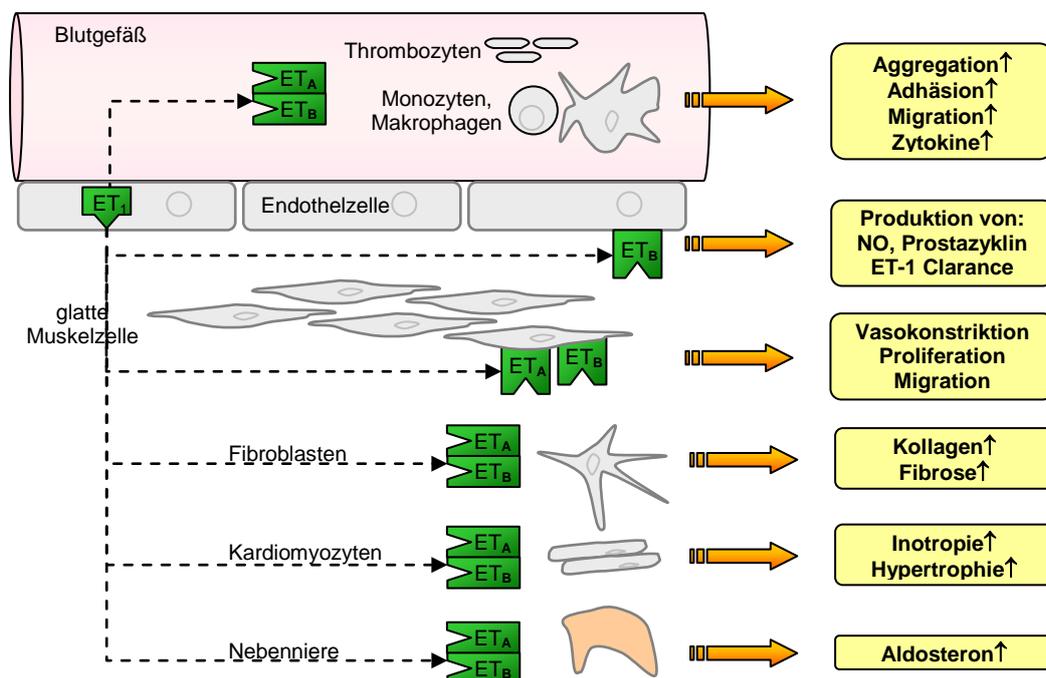


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Endothelin-1 Effekten in verschiedenen Zelltypen. ET_A = ET_A -Rezeptor, ET_B = ET_B -Rezeptor (Anlehnung an Galié et al., 2004)

In der Pathogenese der Arteriosklerose spielen Endotheline offenbar auch eine pathophysiologische Rolle. Untersuchungen an hyperlipämischen Tieren und Menschen mit Atherosklerose ergaben erhöhte ET-Spiegel (Horio et al., 1991; Lerman et al., 1991). In arteriosklerotischen Plaques wurden ebenfalls erhöhte ET-Spiegel nachgewiesen (Zeher et al., 1995; Ihling et al., 1996). Oxidiertes LDL stimuliert die ET-1 Produktion in Endothelzellen und Makrophagen (Martin-Nizard et al., 1991). In arteriosklerotischen Plaques sind Endothelinrezeptoren nachgewiesen worden. Dabei wurde in verschiedenen Studien eine Verzögerung der Arterioskleroseentstehung durch ET_A -Rezeptorantagonisten festgestellt (Barton et al., 2000; Barton et al., 1998b). Des Weiteren findet sich in arteriosklerotischen Läsionen menschlicher Koronararterien eine erhöhte Konzentration von ECE-1

sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Makrophagen. Dies lässt auf eine vermehrte Synthese von ET-1 schließen (Minamino et al., 1997).

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie wurden bisher normale, aber auch erhöhte Plasmaspiegel für Endothelin gefunden. Dies kann daraufhin zurückzuführen sein, dass das Endothelinsystem seine Wirkung vor allem para- und autokrin entfaltet und die Messung des direkten Gewebespiegels beim Menschen schwierig zu praktizieren ist. Die vierwöchige Gabe des dualen ET_A/ET_B-Rezeptorantagonisten *Bosentan* bei Patienten mit essentieller Hypertonie konnte den diastolischen Blutdruck um ca. 5,7 mmHg senken, was mit der Wirkung des AT-1 Angiotensin-2 Rezeptorantagonisten *Losartan* vergleichbar wäre (Krum et al., 1998). Die Gabe führte zu keiner Aktivierung des Sympathikus oder des Renin-Angiotensin-Systems. *Bosentan* ist der erste duale ET_A/ET_B-Rezeptorantagonist seiner Klasse (Clozel et al., 1993).

Bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie (PPH) sind ET-1 Plasmaspiegel erhöht und korrelieren mit dem rechtsatrialen Druck; hierbei ist jedoch nicht geklärt, ob dies Folge oder Ursache einer PPH ist (Stewart et al., 1991; Cacoub et al., 1993). In mehreren klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Gabe von *Bosentan* die Prognose von Patienten mit PPH verbessern kann. In einer ersten Pilotstudie wurden 32 NYHA Klasse-III Patienten randomisiert und mit 125 mg *Bosentan* versus Placebo behandelt. Nach 12 Wochen konnte eine Verbesserung des kardialen Indexes, des pulmonalarteriellen Druckes und der Resistance im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Channik et al., 2001; Channik et al., 2004). Die randomisierte, doppelblinde Fall-Kontrollstudie *BREATH-1*, ist die bisher umfangreichste Untersuchung. Hierbei wurden 213 NYHA-Klasse III bis IV Patienten initial mit 62,5 mg, später 125 mg oder 250 mg *Bosentan* versus Placebo therapiert. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Verbesserung der sogenannte *exercise capacity*, welche anhand eines 6-Minuten-Gehtests ermittelt wurde (Rubin et al., 2002). Der selektive ET_A-Rezeptorantagonist *Sitaxsentan* verbessert bei Patienten mit PPH mit NYHA Klasse II-IV nachdrücklich hämodynamische Eigenschaften und die *exercise capacity* (Galie et al., 2004).

Eine weitere wichtige Rolle spielen Endotheline bei der salzsensitiven Hypertonie. Bei zu Schlaganfall neigenden spontan hypertensiven Ratten (SHRSP) wurde beobachtet, dass sich bei salzsensitiven Ratten nach salzreicher Kost spontan ein erhöhter systolischer Blutdruck, eine erhöhte renale Ausscheidung von ET-1 sowie eine erhöhte ET-1 mRNA Expression einstellt. Des Weiteren waren der

Glomerulosklerose-Index und der Index für tubulointerstitiellen Schaden erhöht. Das Verhältnis der Rezeptorsubtypen verschiebt sich in Richtung des ET_A-Rezeptors. (Rothermund et al., 2001). Die selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten *J-1-05859* und *LU135252* konnten bei salzsensitiven Dahl-Ratten unter salzreicher Kost im Vergleich zur Kontrollgruppe den Blutdruck senken. Morbidität und Mortalität wurden bei salzsensitiven Dahl-Ratten ebenfalls gesenkt (Okada et al., 2000; Barton et al., 1998a; Remuzzi et al., 2002). Bei Patienten mit salzsensitiver Hypertonie wurden erhöhte Endothelin-Spiegel im Plasma festgestellt (Elijovich et al., 2001). Eine Übersicht über weitere Endothelin-Rezeptorantagonisten gibt die Arbeit von Lüscher et al. (Luscher et al., 2000).

Weiterhin hat Endothelin-1 eine pathophysiologische Bedeutung bei Myokardischämie, kongestiver Herzinsuffizienz, Myokardfibrose, inflammatorischer Kardiomyopathie und Myokarditis (Yang et al., 2005). Die Verabreichung von ET-1 in porcine Koronarien führt zu Kontraktion, Myokardischämie und ventrikulären Arrhythmien (Ezra et al., 1989). Bereits ein paar Stunden nach Myokardinfarkt steigt der Plasmaspiegel von Endothelin-1 um mehr als das fünffache an (Stewart et al., 1991). Bei Hunden mit induziertem Myokardinfarkt führte die Verabreichung des selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten *BQ-123* zu einer Reduktion der Infarktgröße von mehr als 40% (Kedzierski et al., 2001). Bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz sind ebenfalls die Plasmaspiegel für Endothelin erhöht. In einer weiteren Studie wurde die Gabe von *Bosentan* versus Placebo untersucht. Dabei stieg der kardiale Index um 13% im Gegensatz zur Kontrollgruppe (Kedzierski et al., 2001). Die Gabe von *BQ-123* erhöht die Lebenserwartung von Ratten mit kongestiver Herzinsuffizienz um das Doppelte (Kedzierski et al., 2001). Die bisher neueste sogenannte *EARTH*-Studie beinhaltete 642 Patienten mit moderater bis schwerer kongestiver Herzinsuffizienz Grad NYHA II-III. In dieser randomisierten, doppelblinden Fall-Kontroll-Studie wurde der Effekt des selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten *Darusentan* versus Placebo als zusätzliche Gabe zur optimalen Therapie untersucht. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe. Eine Kombinationstherapie mit ET-Rezeptorantagonisten scheint daher nicht sinnvoll zu sein. Aufgrund ethischer Gesichtspunkte kann jedoch keine Studie zur Monotherapie mit ET-Rezeptorantagonisten durchgeführt werden (Anand et al., 2004; Kirchengast et al., 2005).

In der Niere reguliert das Endothelinsystem die Reabsorption von Natrium und Wasser, die renale Perfusion und den Säure-Basen-Haushalt. Physiologischerweise vermittelt ET-1 eine gesteigerte Natriuresis und eine Diuresis in der Niere (Pollock et al., 2000). Im Nierenmark inhibiert ET-1 die Reabsorption von Salz, während es im Nierenkortex die Natriumausscheidung reduziert (Pollock et al., 2000; Kedzierski et al., 2001). Endothelin-1 führt außerdem im Tierversuch zu einer Verschlechterung einer Niereninsuffizienz, was durch die Gabe von ET_A-Rezeptorantagonisten effektiv aufgehoben werden kann (Orth et al., 2001). In-vivo-Studien an Ratten mit Hypertonie und erhöhten AT-II Werten im Plasma ergaben gesteigerte Expressionswerte für Präpro-Endothelin mRNA und ET-1 im Nierengewebe (Pollock et al., 2005). Eine ET_A-Rezeptorblockade verhindert die renale Vasokonstriktion von akut infundiertem AT-II (Riggleman et al., 2001). Bei Versuchen an gesunden Probanden ergab die systemische Infusion von AT-II in Verbindung mit *BQ-123* einen signifikant geringeren Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes, des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate im Gegensatz zur alleinigen Infusion mit AT-II (Montanari et al., 2003). Dies deutet daraufhin, dass Endotheline bei der Vermittlung von AT-II Effekten an der Niere eine entscheidende Rolle spielen. Bei Ratten mit diabetischer Nephropathie wurde gezeigt, dass *Bosentan* die Entwicklung von Hypertonie, renaler Vasokonstriktion, Proteinurie und Niereninsuffizienz verhindern konnte. Dies glich dem Effekt der parallel untersuchten Gruppe, welcher *Enalapril* verabreicht wurde (Ding et al., 2003).

Bei Patienten, die nach einer Subarachnoidalblutung (SAB) zerebrale Vasospasmen erleiden, sind die Endothelinspiegel im Plasma und Liquor signifikant erhöht (Suzuki et al., 2000; Juvela et al., 2002). Die systemische Gabe des ET_A-Rezeptorantagonisten *TBC-11251* kann bei Kaninchen das Auftreten von Vasospasmen nach SAB vermindern (Wanebo et al., 1998). Die intravenöse Gabe des gemischten ET-Rezeptorantagonisten *TA-0201* nach SAB verhindert bei Hunden zerebrale Vasospasmen sowie begleitende pathologische Gefäßwandveränderungen (Kikkawa et al., 1999).

Eine weitere Rolle spielt ET-1 wahrscheinlich bei der Neointimabildung und der Restenose nach Ballondilatation (PTCA). Hier wirkt, wie bereits beschrieben, ET-1 als ein Ko-Mitogen in glatten Gefäßmuskelzellen. In tierexperimentellen Modellen mit Ratten und Kaninchen ist eine vermehrte Expression von ET-1 und seinen Rezeptoren gezeigt worden (Wang et al., 1996; Azuma et al., 1994; Azuma et al.,

1995). Bei Ratten kann die Neointimabildung nach Ballondilatation durch Applikation von ET-1 verstärkt (Trachtenberg et al., 1993; Douglas et al., 1993) und durch Gabe von ET_A/ET_B-Rezeptorantagonisten abgeschwächt werden (Douglas et al., 1994a; Douglas et al., 1994b; Tsujino et al., 1995).

Es wurde außerdem gezeigt, dass Meningeome und multiforme Glioblastome hohe Konzentrationen an ET-Rezeptoren exprimieren (Harland et al., 1998). In malignen, humanen Melanomzelllinien scheinen Endotheline über den ET_B-Rezeptor mit für das Wachstum verantwortlich zu sein. Durch Gabe von dem selektiven ET_B-Rezeptorantagonist *BQ-788* konnte das Wachstum inhibiert werden (Lahav et al., 2005). Beim Mammakarzinom wurden im Gegensatz zum normalen Gewebe der Brust erhöhte Werte für ET-1, für ET-3 und für ET_B-Rezeptoren beobachtet. Möglicherweise spielen Endotheline hier eine Rolle bei der Tumorzellinvasion, bei der Resistenz gegen natürliche Apoptosemechanismen sowie bei der Bildung von Metastasen. Die ET-Rezeptorantagonisten *BQ-123* und *BQ-788* konnten in der Tumorzelllinie HTH-K von Mäusen das Wachstum der Tumore verlangsamen (Grimshaw et al., 2005).

2.2 Das Endothelin-Konversionsenzym

2.2.1 Biochemische Struktur, subzelluläre Lokalisation und Enzymkinetik

Endothelin-Konversionsenzym 1

ECE-1 agiert als eine membranständige, neutrale Zink-Metalloprotease. Es gehört zur Gruppe der Typ II Membranproteine, deren N-Terminus im Zytoplasma der Zelle lokalisiert ist (Schmidt et al., 1994; Turner et al., 1996; Xu et al., 1994). Zwei ECE-Moleküle bilden über eine Disulfidbrücke ein Dimer, wodurch die Substratumsatzgeschwindigkeit stark erhöht wird. Im dimerisierten Zustand beträgt das Molekulargewicht 250 kDa (Shimada et al., 1996). Das pH-Optimum liegt bei 6,8. Die Substrate werden mit einer Affinität von big ET-1 > big ET-2 >> big ET-3 umgesetzt (Turner et al., 1996). ECE-1 ähnelt in seiner Sequenz der Neutralen Endopeptidase (NEP), sowie dem Blutgruppenantigen Kell (Xu et al., 1994). ECE-1 ist sowohl innerhalb der Plasmamembran, auf intrazytoplasmatischen Membranen sowie in intrazellulären Vesikeln zu finden. Dabei befindet sich die katalytische Domäne extrazellulär bzw. extrazytoplasmatisch, was durch immunhistochemische Studien an endothelialen Zellen und durch den Einsatz spezifischer Antikörper festgestellt werden konnte (Takahashi et al., 1995). In aortalen Endothelzellen

konnten elektronenmikroskopisch big ET-1 und auch ET-1 nachgewiesen werden (Harrison et al., 1995). Die intrazelluläre Lokalisation von ECE-1 wird durch Transfektionsexperimente mit CHO-Zellen bestätigt, in denen diese sowohl mit ppET als auch mit ECE-1 kotransfiziert wurden. Daraufhin bildeten die Zellen intrazellulär big ET-1 und schließlich auch ET-1. Phosphoramidon, welches sowohl intra- als auch extrazellulär wirkt, konnte diesen Prozess inhibieren, während dies mit *FR901533*, als rein extrazellulär wirkender Substanz, nicht gelang (Xu et al., 1994; Matsumura et al., 1995).

Endothelin-Konversionsenzym 2

Die cDNA von ECE-2 wurde erstmalig 1995 für die bovine und später für die humane Spezies beschrieben. Es agiert als membrangebundene phosphoramidon-sensitive Metalloprotease. Es hat eine Länge von 682 Aminosäuren mit einem spezifischen pH von 5,5. Zwischen ECE-1 und ECE-2 besteht eine Homologie von 59%. Es besitzt eine ähnliche Substratspezifität wie ECE-1 mit einer Affinität zu big ET-1 > big ET-2 > big ET-3. Lokalisiert ist ECE-2 in den Membranen der Vesikel des Golgi-Apparates und in exozytotischen Vesikeln, was das niedrige pH-Optimum erklärt (Emoto et al., 1995). Das humane ECE-2 Gen konnte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungstechnik (FISH) auf dem Chromosom 3q28-q29 lokalisiert werden (Lorenzo et al., 2001).

Endothelin-Konversionsenzym 3

ECE-3 wurde 1998 aus der bovinen Iris extrahiert. Bei dem Enzym handelt es sich um eine phosphoramidon-sensitive Metalloprotease. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa. Das pH-Optimum liegt bei 6,6. Es katalysiert spezifisch die Umwandlung von big ET-3 zu ET-3 (Hasegawa et al., 1998).

X-Konversionsenzym

XCE (syn ECEL-1) wurde 1999 von Valdenaire et al. erstmalig isoliert. XCE gehört zu der Familie der ECE und NEP und ist ein 775 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 95 kDa. Es besitzt eine Homologie von 53% mit ECE und 48% mit NEP. Der Name rührt daher, dass bisher kein Substrat gefunden werden konnte, welches von diesem Enzym umgesetzt wird (Valdenaire et al., 2000).

Alle drei Konversionsenzyme lassen sich durch die relativ unspezifischen Proteinaseinhibitoren Phosphoramidon und *FR901533*, sowie EDTA inhibieren (Opgenorth et al., 1992).

2.2.2 Gewebespezifische Expression von ECE-1, ECE-2, ECE-3 und XCE

ECE-1 mRNA wird in menschlichem Gewebe, vor allem im gesamten respiratorischen System, in nahezu allen Gefäßendothelzellen des kardiovaskulären Systems, in Kardiomyozyten, im Plexus myentericus Auerbach, in den Azinuszellen des Pankreas, in der Niere sowie in geringerem Umfang im Gastrointestinaltrakt exprimiert (Xu et al., 1994; Korth et al., 1999). ECE-2 mRNA wurde vor allem im zerebralen Kortex, Zerebellum und der Nebenniere per Northern Blot Analysen detektiert. Auch Endothelzellen von Koronararterien weisen ECE-2 mRNA auf (Emoto et al., 1995). Über die Lokalisation von ECE-3 liegen bisher, außer dem Isolationsort in boviner Iris, keine weiteren Daten vor. XCE kommt in Skelettmuskel, Pankreas und im ZNS vor (Valdenaire et al., 2000).

2.2.3 Bedeutung von ECE-1

Eine physiologische Bedeutung besitzt ECE-1 in der renalen Homöostase (Salz- und Säure-Basen-Haushalt), in der Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus sowie bei der zentralen Regulierung der Atmung. Pathophysiologisch erhöhte Aktivität weist ECE-1 bei Erkrankungen mit einem abnorm erhöhten vaskulären Tonus, chronischer Gewebeschädigung, *Remodeling* und inflammatorischen Prozessen auf (Kedzierski et al., 2001). Nach Ballondilatation der Arteria carotis communis von Ratten kommen in den glatten Gefäßmuskelzellen erhöhte Expressionswerte für ECE-1 mRNA vor. Die Gabe von Phosphoramidon konnte die Ausbildung der Restenose verringern (Wang et al., 1996; Minamino et al., 1997). Beim Kaninchen konnte der durch eine Subarachnoidalblutung ausgelöste Vasospasmus durch die Gabe des ECE-1-Inhibitors CGS 26393 verhindert werden (Kwan et al., 2002). Bei Patienten mit Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung konnten erhöhte ET-1-Spiegel und erhöhte ECE-1-Aktivität im Serum und im Liquor beobachtet werden (Juvola et al., 2002; Mascia et al., 2001).

2.2.4 Gewebespezifische und subzelluläre Verteilung der Isoformen des ECE-1

Nach heute gängiger Terminologie werden die vier Isoformen des ECE-1 mit ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d bezeichnet (Shimada et al., 1995; Schmidt et al., 1994; Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999). Die Zuordnung mittels

Immunfluoreszenzmikroskopie der einzelnen ECE-1-Isoformen zu der subzellulären Verteilung verdeutlicht die verschiedenen Lokalisationen von ECE-1 in der Zelle. ECE-1a und ECE-1d sind hauptsächlich auf der Zellmembran lokalisiert, ECE-1d zusätzlich schwach auch noch vesikulär im Bereich des Golgi-Apparates. ECE-1b ist vorwiegend intrazellulär vorhanden. ECE-1c wiederum kommt vor allem auf der Plasmamembran, in geringeren Konzentrationen aber auch im Bereich des Golgi-Apparates vor (Valdenaire et al., 1999; Schweizer et al., 1997). Interessanterweise ist im Gegensatz dazu das ECE-1b in der bovinen Spezies vorwiegend an der Zelloberfläche und das ECE-1a intrazellulär lokalisiert (Schweizer et al., 1997; Emoto et al., 1999). Spezies- und zellspezifische Expressionsmuster der ECE-1 Isoenzyme können daher zu verschiedenen lokalen Endothelinspiegeln führen.

Im Vergleich zur jeweils anderen Isoform ist in Northern-Blots das ECE-1a-Signal in Lunge, Milz, Plazenta, Dünndarm und humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) am stärksten ausgeprägt. Dagegen ist das Signal für ECE-1b in Pankreas, Prostata, Hoden, Kolon und peripheren Leukozyten stärker ausgeprägt (Valdenaire et al., 1995). Die Isoformen ECE-1a und ECE-1b kommen ebenfalls in Herz, Niere und Plazenta vor. ECE-1b kommt auch in Lymphozyten und VSMC vor (Orzechowski et al., 1997). In der Ribonuklease-Protektionsanalyse (RPA) konnte für die ECE-1c-Isoform eine dominierende Expression im Vergleich zu den anderen Isoformen in Lunge, Leber, Herz, Niere, Plazenta, Hoden, Dünndarm und Nebenniere nachgewiesen werden. Dagegen überwiegt in HUVEC die Isoform ECE-1a (Schweizer et al., 1997). ECE-1d kommt vor allem in kultivierten, glatten Gefäßmuskel- und Endothelzellen vor (Valdenaire et al., 1999).

2.2.5 Prinzipien der isoformspezifischen Genexpression

1978 haben Tilghman et al. entdeckt, dass in höheren Organismen die für Gene kodierenden Sequenzen (Exone) diskontinuierlich vorliegen und von nicht kodierenden Sequenzen (Introne) unterbrochen werden. Im ersten Schritt der Translation entsteht durch die Polymerase II und die Kofaktoren der Gruppe TFII-X eine heteronukleäre RNA (hnRNA), die diese Sequenz übernimmt. In weiteren Schritten werden die Introns herausgeschnitten (Spleißen) und es entsteht die reife mRNA. Die Exone der mRNA behalten dabei die gleiche Reihenfolge wie in der DNA. Durch alternatives Spleißen können aus dem Primärtranskript verschiedene Proteine entstehen, die Variationen eines Grundmotivs darstellen. Um auf unterschiedliche Anforderungen wie Entwicklung, Zelldifferenzierung und äußere Einflüsse möglichst

flexibel reagieren zu können, besitzen höhere Organismen prinzipiell drei Mechanismen zur Regulierung der Genexpression auf Ebene der Transkription. Dabei handelt es sich erstens um das alternative Spleißen eines Primärtranskriptes, zweitens die Initiierung mehrerer Ersttranskripte durch alternative Promotoren und drittens um die posttranskriptionelle Prozessierung am 3' Ende (Ayoubi et al., 1996; Goldstrohm et al., 2001). Diese Mechanismen werden sowohl einzeln als auch in Kombination eingesetzt. Für die Generierung der Isoformen des ECE-1 sind vor allem das alternative Spleißen und der Gebrauch von alternativen Promotoren verantwortlich und werden daher im Folgenden näher erläutert.

Alternatives Spleißen

Das Spleißen erfolgt durch die sogenannten Spleißosome, die Komplexe aus mehreren Proteinen und kleinen Kern-RNA Molekülen (snRNA) darstellen. Diese erkennen die entsprechenden Spleißstellen auf der RNA an einer Konsensussequenz, die mit den Basen GU beginnt und mit AG endet. Alternatives Spleißen bedeutet die Aufnahme unterschiedlicher Exone in die reife mRNA. Man unterscheidet dabei vier verschiedene Formen des Spleißens. Erstens das Herausscheiden oder Bestehenlassen eines Introns. Zweitens die alternative Wahl von 5' Spleißstellen oder drittens von 3' Stellen, wodurch die Länge eines Exons verändert wird. Viertens im Entfernen oder Bestehenlassen eines Exons (Goldstrohm et al., 2001). Nach Schätzungen können die RNA-Produkte von ca. 30 Prozent der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden (Black et al., 2000).

Alternative Promotoren

Promotoren stellen sowohl Transkriptionsstartpunkte als auch Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zur Regulierung eines bestimmten Genabschnittes dar. Dabei liegen die Promotoren generell auf dem gleichen Gen, welches sie regulieren und werden deshalb auch als cis-aktive Elemente bezeichnet. Transkriptionsfaktoren, die auf diese Promotoren binden und in einem anderen DNA-Molekül kodieren, werden als trans-aktive Elemente bezeichnet. Bei den meisten Promotoren beginnt die Transkription durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren der Gruppe TFII-X an die DNA. Dabei wird häufig die als TATA-Box bezeichnete Konsensussequenz 5'-T₈₂A₉₇T₉₃A₈₅A₆₃A₈₈A₅₀-3' (der Index gibt das Prozentuale Vorkommen der Base in dieser Position an) durch das TATA-Box-Bindeprotein erkannt (TBP), ein Teil des TFII-D Komplexes. Es folgt die Bildung des Transkriptionskomplexes mit anderen

Faktoren der Gruppe TFII-X und der RNA-Polymerase II und somit die Initiation der Transkription. Zusätzliche Elemente sind z.B. CAAT-Boxen oder GC-Boxen. GC-Boxen kommen häufig in Promotoren von konstitutiven Genen vor. Um eine hohe mRNA Syntheserate zu erreichen und spezifische Gene gezielt anzuregen ist jedoch die Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren essentiell. Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität von Promotoren zu erhöhen, besteht durch die Interaktion mit Enhancern. Diese stimulativen, cis-aktiven Elemente können mehrere tausend Basenpaare entfernt liegen und besitzen keine eigene Promotoraktivität (Werner et al., 1999). Ein Gen kann allerdings auch mehrere alternative Promotoren enthalten, wie dies bei dem Gen für ECE-1 der Fall ist. Dadurch besteht die Möglichkeit, zellspezifisch verschiedene Isoformen zu bilden (Ayoubi et al., 1996).

2.2.6 Genetische Struktur und spezifische Genregulation der Isoformen des ECE-1

Das Gen, welches für die Expression von ECE-1 kodiert, ist über 120 Kilobasen lang, besteht aus 21 bisher nachgewiesenen Exonen und ist auf dem Chromosom 1p25 lokalisiert (Funke-Kaiser et al., 2000). Abb. 5 stellt die Struktur der vier Isoformen dar, welche sich lediglich im 5' Bereich unterscheiden. Die vier Promotoren steuern dabei jeweils die Transkription der Primärtranskripte, welche dann in Abhängigkeit von den jeweiligen Spleißdonor- und -akzeptorstellen alternativ generiert werden (Orzechowski et al., 1997; Valdenaire et al., 1995; Funke-Kaiser et al., 1998; Valdenaire et al., 1999).

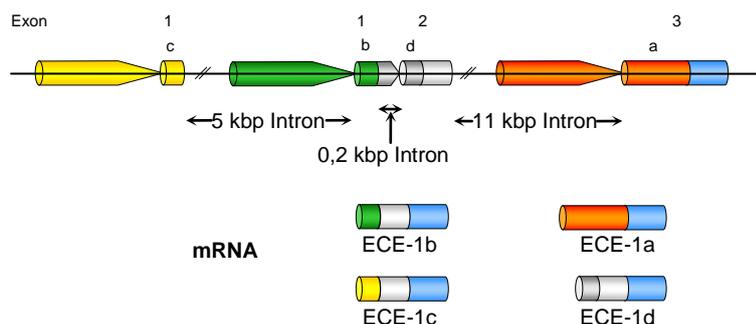


Abbildung 5: Schematische Darstellung der genomischen Organisation der humanen ECE-1 Isoformen und ihrer mRNA-Struktur. Spitz zulaufende Struktur= Promotor

Allen Isoformen ist der in Abb. 5 blau dargestellte Bereich der Exone 4-19 und des 3' Teils des Exons 3 gemeinsam. Während die Isoform A das Exon 3a enthält, wird dieses bei allen anderen Isoformen nach dem Prinzip des oben erläuterten alternativen Spleißens herausgeschnitten. Die Isoform ECE-1d enthält zusätzlich den Abschnitt 2b und 2d. Zur Isoform B wird das Exon 1b hinzugefügt (Valdenaire et al.,

1999; Orzechowski et al., 1997). Die Länge des Introns zwischen 1c und 1b beträgt 55 Kilobasen (Funke-Kaiser et al., 2000). Der Intronbereich zwischen Exon 2b und Exon 3a weist eine Länge von 11 Kilobasen auf, während der Bereich zwischen Exon 1b und Exon 2d ca. 207 Basenpaare beträgt (Orzechowski et al., 1997).

2.2.7 Promotorstruktur der ECE-1-Isoformen

Allen Promotoren der ECE-1 Isoformen fehlen die üblichen transkriptionellen Startsequenzen. Der ECE-1b und der ECE1d Promotor weisen mehrere putative Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1, der ECE-1a Promotor für Ets-1 auf (Orzechowski et al., 1997; Funke-Kaiser et al., 2000). Weitere Konsensussequenzen im ECE-1a Promotor sind in Abb. 6 dargestellt und deuten bei geringgradiger basaler Expression von ECE-1a mRNA auf einen induzierbaren Promotor hin (Orzechowski et al., 1997; Valdenaire et al., 1995). Im Unterschied dazu konnte mittels RPA-Analyse gezeigt werden, dass die ECE-1c mRNA in allen untersuchten Geweben oder Zellen exprimiert wird, teilweise deutlich stärker als die anderen Isoformen, was einem konstitutiven Expressionsmuster entspricht. Dazu passt, dass der ECE-1c Promotor strukturelle Merkmale eines *Housekeeping*-Promotors aufweist (Schweizer et al., 1997; Funke-Kaiser et al. 2000; 2003).

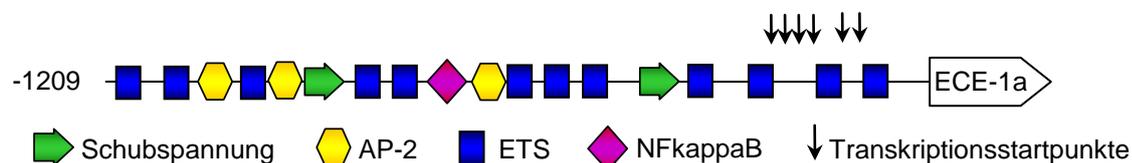


Abbildung 6: Struktur des humanen ECE-1a Promotors. Die Symbole stellen die potentiellen Bindungsstellen für Schubspannung (shear stress), AP-2, ETS-Proteine und NFkappaB sowie die Transkriptionsstartpunkte (Pfeile) dar (modifiziert nach Orzechowski et al., 1997).

2.3 Die ETS-Familie der Transkriptionsfaktoren

Die ETS-Onkogene (*v-ets* oder „e twenty-six“) wurden ursprünglich als Teil des Erythroblastomavirus des Vogels identifiziert. ETS bedeutet „E26 transformations-spezifisch“ und bezeichnet eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die über eine hoch konservierte Region mit einer Länge von 84 Aminosäuren verwandt sind, die sogenannte *ETS-Domäne*. Diese vermittelt unter Ausbildung einer Variante des *Winged-Helix–Turn–Helix*-Motivs die spezifische Bindung an die DNA. Diese besteht aus drei alpha-Helixstrukturen und vier beta-Faltblattstrukturen. Der Hauptkontaktpunkt zur DNA liegt in der dritten alpha-Helixstruktur. Die Konsensussequenz enthält das Kernmotiv mit den Basen GGA und jeweils

flankierende Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 20 Basenpaaren (Sharrocks et al., 1997). Die unterschiedlichen flankierenden Sequenzen sind dabei für Affinitätsunterschiede der Mitglieder der ETS-Familie zu der Bindungssequenz verantwortlich. Zusätzlich vermittelt die *ETS-Domäne* auch Protein-Protein Interaktionen, die entweder intramolekular stattfinden oder durch Kofaktoren vermittelt werden und entscheidende regulatorische Funktionen beinhalten. Obwohl für viele ETS-Domänen bestimmte Präferenzen zu einer Bindungsstelle aufgezeigt werden konnten, überlappen die Bindungsaffinitäten zu anderen Bindungsstellen doch erheblich. Dies impliziert, dass es zusätzlich verstärkende Mechanismen geben muß, die zu einer DNA-Bindung führen, um wahlloses Binden mehrerer Transkriptionsfaktoren an die ETS-Bindungsstelle zu verhindern (Sharrocks et al., 2001). Die ETS-Familie wird in mindestens 10 Unterfamilien eingeteilt. Dies geschieht auf dem Boden von Sequenzähnlichkeiten in weiteren konservierten Domänen. Dabei sind sowohl aktivierende als auch repressorische Eigenschaften der einzelnen ETS-Familienmitglieder beschrieben (siehe unten Tabelle 1) (Sharrocks et al., 1997; Sharrocks et al., 2001).

Ets-Subfamilie	
Ets-1	Aktivator
Ets-2	Aktivator
TCF-Subfamilie	
Elk-1	Aktivator / Repressor
SAP-1	Aktivator
SAP-2/Net	Aktivator / Repressor
<i>Lin-1</i>	Repressor
ERG-Subfamilie	
ERG	Aktivator
Fli-1	Aktivator
PEA3-Subfamilie	
PEA3	Aktivator
ERM	Aktivator
ER81	Aktivator
GABP-Subfamilie	
GABP-alpha	Aktivator
Elf-Subfamilie	

Elf-1	Aktivator
NERF-1/-2	Aktivator / Repressor
MEF	Aktivator
Spi-Subfamilie	
PU.1	Aktivator
SpiB	Aktivator
SpiC	Aktivator
Yan-Subfamilie	
Yan	Repressor
TEL	Repressor
TEL-2	Repressor
ERF-Subfamilie	
ERF	Repressor
PE-1	?
Andere	
ESE-1/-2/-3	Aktivator / Repressor
PDEF	Aktivator
ER71	?

Tabelle 1: Die Unterfamilien der ETS-Familie (modifiziert nach Sharrocks et al., 1997; Sharrocks et al., 2001).

Bisher wurden die Transkriptionsfaktoren Ets-1, ERG, Fli-1, TEL und NERF-2 u.a. in Endothelzellen nachgewiesen (Sato et al., 2001a). Aufgrund der später erläuterten Ergebnisse dieser Arbeit mittels computerbasierter Analyse und der Transfektionsuntersuchungen, die vorwiegend an Endothelzellen durchgeführt wurden, werden im Folgenden die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und NERF einleitend genauer dargestellt.

2.3.1 Der Transkriptionsfaktor Ets-1

Entdeckung und Struktur

Ets-1 wurde erstmalig 1983 beschrieben (Leprince et al., 1983). Das zelluläre Ets-1-Gen (c-Ets-1) ist das Protoonkogen des viralen Gens und ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert. In der humanen T-Zelllinie CEM konnten insgesamt sechs verschiedene Isoformen des Ets-1 Genproduktes nachgewiesen werden. Diese weisen verschiedene Molekularmassen auf und unterteilen sich in vier Hauptformen mit 51 kDa (p51), 48 kDa (p48), 42 kDa (p42), 39 kDa (p39) sowie zwei Nebenformen mit

52 kDa (pp52) und 49 kDa (pp49). Während die Formen pp52 und p51 hauptsächlich im Zytoplasma vorkommen, treten die Formen p48, p42 und p39 hauptsächlich im Nukleus auf. Die verschiedenen Isoformen werden durch alternatives Spleißen der mRNA und durch Proteinphosphorylierung generiert (Koizumi et al., 1990). Im Western Blot von nukleären Extrakten aus CEM-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch kovalente Modulation der Sulfonylharnstoffgruppen durch den Proteaseinhibitor TLCK (N-p-tosyl-L-Lysine chloromethyl Keton) aus der Isoform p51 die Isoform p48 und aus p42 die Isoform p39 entstehen kann (Fisher et al., 1992).

Die Struktur des Transkriptionsfaktors Ets-1 ist in Abb. 7 dargestellt. Die Arbeitsgruppe Wasylyk et al. hat das Protein in sechs Abschnitte mit unterschiedlicher funktioneller Bedeutung eingeteilt, die mit den Buchstaben A-F von N-terminal nach C-terminal benannt werden (Wasylyk et al., 1993). Die **Region A** kann dabei möglicherweise eine Zinkfingerstruktur ausbilden und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. Sie beinhaltet die ersten 27 Aminosäuren. Die **Region B** erstreckt sich von den AS 28 bis 129. Es handelt sich um eine hoch konservierte Region zwischen den Transkriptionsfaktoren Ets-1, Ets-2, ERG, Fli-1 und GABP. Sie beinhaltet die *Pointed*-Domäne, die eine gebündelte Region aus fünf alpha-Helices darstellt (Wasylyk et al., 2002). Diese wurde für Aufgaben wie Homo-Oligomerisation, Hetero-Dimerisation und Repression identifiziert. Sie enthält eine Bindungsstelle für EAP1/Daxx, durch dessen Bindung Ets-1 repressorische Eigenschaften vermittelt (Li et al., 2000b). Es gibt mehrere Ets-1-Isoformen, die diese Region nicht beinhalten (Wasylyk et al., 1993). An der Aminosäurestelle 38 befindet sich eine Phosphorylierungsstelle für die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK). Die enge Verbindung der Phosphorylierungsstelle und der Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren scheint daraufhin zu deuten, dass so der Effekt der MAPK auf Ets-1 zusätzlich reguliert werden kann. Die **Region C** besteht aus den AS von 130 bis 243 und ist identisch mit der von Sharrocks et al. beschriebenen Transaktivierungsdomäne (TAD). Sie wirkt verstärkend auf die Protein-DNA-Bindung von Ets-1. Der Faktor CBP/p300 bindet an diese Region in Form eines Koaktivators (Sharrocks et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor Sp100 bindet vor allem an die TAD, benötigt aber dabei auch alle anderen Regionen von Ets-1 und fungiert als Transaktivator (Wasylyk et al., 2002). Die **Region D** (AS 244-330) beinhaltet mehrere Phosphorylierungsstellen für die Calcium-Calmodulin-abhängige-Proteinkinase-II (CaMK2). Zwei alpha-helikale Strukturen (Hi) der Region D, die in Verbindung mit

einer alpha-Helix (Hi) der **Region F** stehen, bewirken eine Konformationsänderung der ETS-Domäne und üben somit eine autoinhibitorische Funktion aus. Dabei kommt es zu einer Interaktion mit der alpha-Helix-1 (H1) der ETS-Domäne. Die Phosphorylierung der Region D an einer Serin-reichen Region durch die CaMK2 verstärkt die Autoinhibition der DNA-Bindung. Die Bindung des Transkriptionsfaktors RUNX1 (AML-1/CBF- α 2) verhindert die Autoinhibition (Sharrocks et al., 2001; Pufall et al., 2002a). Die Region D hat eine wichtige regulierende Funktion und wird durch alternatives Spleißen in den Isoformen p42 und p39 entfernt. Die Isoformen p48, p51, pp49 und pp52 beinhalten diese Region und sind somit durch zusätzliche Signaltransduktionswege beeinflussbar (Koizumi et al., 1990).

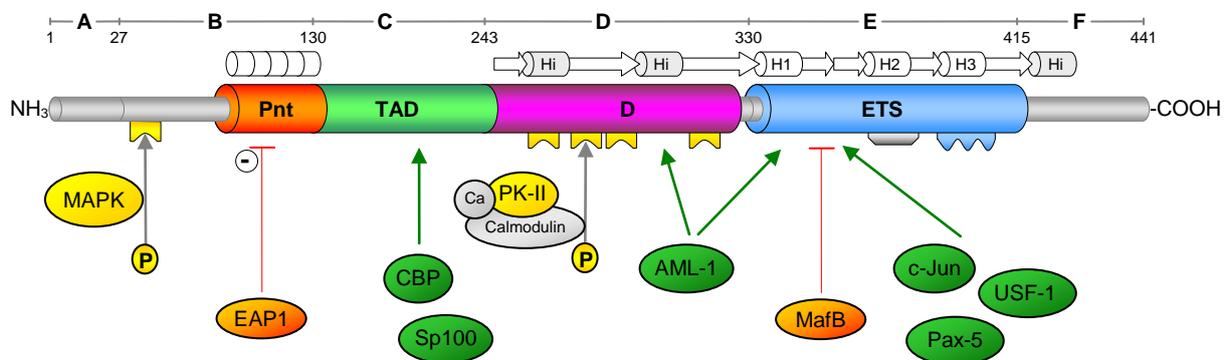


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Struktur des Ets-1 Proteins. Die Buchstaben A-F bezeichnen verschiedene funktionelle Regionen, die Zahlen darunter die Position der Aminosäure. NH₃ = N-terminales Ende, COOH = C-terminales Ende. Farbige Zylinder markieren funktionelle Domänen (Pnt = *Pointed* Domain, TAD = transaktivierende Domäne, D = D-Domäne, ETS = Erythroblast transformationsspezifische Domäne). Weiße Pfeile kennzeichnen β -Faltblattstrukturen, weiße Zylinder (H1-H3) alpha-Helix-Strukturen, Hi geben inhibitorisch wirkende alpha-Helix-Strukturen an. Grüne Kreise stehen für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die die Protein-DNA-Interaktion von Ets-1 fördern (CBP, Sp100, AML-1, cJun, Pax-5, USF-1). Der Transkriptionsfaktor MafB wirkt inhibitorisch auf die Protein-DNA-Interaktion von Ets-1. EAP1 wirkt als Korepressor. P = Phosphor. MAPK = Mitogen-aktivierte-Proteinkinase, PK-II = Calcium-Calmodulin-abhängige-Proteinkinase-II. Gelbe Strukturen am Protein markieren Phosphorylierungsstellen. Das graue Motiv an der ETS-Domäne steht für das nukleäre Transitsignal. Die blaue Struktur an der ETS-Domäne bezeichnet die Bindungsregion der alpha-Helix-Struktur H2, die an das GGAA/T Motiv der DNA bindet.

Die **Region E**, die sich über die AS 330 bis 415 erstreckt, entspricht ungefähr der Region der ETS-Domäne (Erythroblasten transformationsspezifische Domäne), die die AS 334 bis 418 enthält. Die ETS-Domäne besteht aus vier beta-Faltblattstrukturen und drei alpha-Helices. Sie vermittelt die Bindung von Ets-1 an die DNA. Die alpha-helikale Struktur H3 ist für die Bindung an das Kernmotiv GGAA/T verantwortlich. Die alpha-Helix H1 bindet entweder an inhibitorische Helices der anderen Domänen oder über mehrere Phosphat-Kontakte direkt an die DNA (Sharrocks et al., 1997; Pufall et al., 2002a). Im Bereich der AS 377 bis 383 befindet sich das nukleäre Signalpeptid, welches eine entscheidende Rolle bei der

Penetration durch die Kernwand spielt (Koizumi et al., 1990). An die ETS-Domäne bindet eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, darunter der im Faktor AP-1 enthaltene Teil c-Jun, bHLH-Proteine (z.B. USF-1) und Pax-5, die die Protein-DNA-Bindung erleichtern. Es binden aber auch hZIP-Proteine wie MafB, die das Gegenteil bewirken (Sharrocks et al., 1997; Sharrocks et al., 2001, Pufall et al., 2002b).

Pathophysiologische Bedeutung

Eine entscheidende Rolle spielt Ets-1 in der Angiogenese. In Hühnerembryonen wird Ets-1 mRNA in Endothelzellen während der Bildung von Blutgefäßen synthetisiert (Vandenburger et al., 1989). Weiterhin wird Ets-1 bei der Angiogenese in Endothelzellen menschlicher Embryonen sowie während der Wundheilung in Granulationsgewebe und vor allem bei der Vaskularisierung von Tumoren vermehrt exprimiert. Der angiogenetische Tumornekrosefaktor TNF-alpha erhöht vorübergehend die Expression von Ets-1 in HUVEC (Wernert et al., 1992). Vascular endothelial growth factor (VEGF) erhöht die Ets-1 mRNA Expression in HUVEC, ECV-304-Zellen und Humanen-mikrovaskulären-Endothelzellen der Lunge (HMVEC-L). Weiterhin stimuliert VEGF die Proliferation und Migration von Endothelzellen. Durch Inhibition von Ets-1 durch Ets-1-antisense-Oligodesoxynukleotide konnte die Endothelzellmigration gehemmt und die Expression von Ets-1 mRNA verringert werden (Iwasaka et al., 1996; Chen et al., 1997; Sato et al., 2001a). Gewebespezifische Ets-1 *Knockouts* haben die Schlüsselrolle des Transkriptionsfaktors beim Überleben von T-Zellen sowie in der Produktion von natürlichen Killerzellen aufgezeigt (Sharrocks et al., 2001).

2.3.2 Der Transkriptionsfaktor NERF

Entdeckung und Struktur

Der Transkriptionsfaktor NERF wurde erstmalig 1996 beschrieben (Oettgen et al., 1996). NERF bedeutet „new Ets-related factor“. NERF ist aufgrund seiner hohen Strukturhomologie zu Elf-1 der Elf-Subfamilie der ETS-Proteine zugeteilt worden (Oettgen et al., 1996). Mittels Northern-Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von NERF mRNA in humanem, erwachsenen Geweben vorkommen (Herz, Plazenta, Lunge, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Hoden und Ovarien). Bisher sind zwei Hauptisoformen bekannt (NERF-1 und NERF-2). Von NERF-1 werden zwei Unterformen exprimiert, die als NERF-1a und NERF-1b bezeichnet werden, welche durch alternatives Spleißen generiert werden. Dabei fehlt

der Isoform NERF-1a die Transaktivierungsdomäne, die Teil der Isoform NERF-2 ist. Ebenso wie Ets-1 besitzt NERF mehrere putative Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C sowie für MAP-Kinasen (Oettgen et al., 1996). Weiterhin besteht die Möglichkeit der Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor AML-1 (Cho et al., 2004). Die Isoformen NERF-2 und NERF-1a konnten in Endothelzellen nachgewiesen werden (Sato et al., 2001a).

Pathophysiologische Bedeutung

NERF, wie auch Ets-1, kann mit AML-1 direkt interagieren. AML-1 ist ein wichtiger Aktivator des „B lymphoid kinase“-Promotors. Dieser enthält ausserdem eine putative Bindungsstelle für NERF in der Nähe der Bindungsstelle für AML-1. Der „B lymphoid kinase“-Promotor kodiert für die „B lymphoid kinase“, welche eine B-Zell spezifische Tyrosinkinase ist, die in prä-B-Zellen und erwachsenen B-Lymphozyten vorkommt. Dabei agiert die Isoform NERF-2 durch Interaktion mit AML-1 als Aktivator des Promotors, während die Isoform NERF-1a durch Bindung an AML-1 zu einer Repression der Aktivierung des Promotors führt (Cho et al., 2004). Da die Isoformen NERF-2 und NERF-1a auch in Endothelzellen nachgewiesen wurden (Sato et al., 2001a) könnte dieser Transkriptionsfaktor theoretisch eine Rolle in der Regulierung des ECE-1a Promotors spielen. In der Diskussion wird dazu genauer auf dieses Modell eingegangen.

3 Fragestellung

Zwischen dem humanen und bovinen ECE-1a Promotor besteht eine 71%ige Sequenzhomologie. Beide Promotoren weisen eine ungewöhnlich hohe Dichte an Konsensussequenzen für Bindung von Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie auf (Orzechowski et al., 1997, 1999). Die Stimulation von humanen EA.hy926-Endothelzellen mit Phorbol ester induzierte eine Neusynthese des TFs Ets-1 mit nachfolgender isoformspezifischer Aufregulation der Expression von ECE-1a, was auf einen funktionellen Zusammenhang hindeutete (Orzechowski et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb die transkriptionelle Regulation des ECE-1a Promotors und die Bedeutung von putativen Bindungsstellen für ETS-Proteine funktionell untersucht werden.

Folgende experimentelle Methoden wurden zur Beantwortung dieser Fragestellung angewandt :

1. Identifizierung evolutionär konservierter, putativer Bindungsstellen für ETS-Proteine im ECE-1a Promotor durch computerbasierte Analyse.
2. Analyse von Proteinbindung an die identifizierten putativen Bindungsstellen mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).
3. Funktionelle Promotoranalysen mittels transienter Transfektionsassays einschließlich Mutationsanalyse.

4 Methoden

4.1 Computerbasierte Analyse

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurden der bovine und humane ECE-1a Promotor mit der Software *MatInspector Release professional 6.2.2* und *MatInspector library: Matrix Family Library version 3.3* analysiert. Dabei wurde für die „core“ und „matrix similarities“ jeweils der Wert 0.9 vorgegeben, d.h. es wurden nur die Stellen herausgesucht, die zu 90% mit der beschriebenen DNA-Bindungssequenz für Ets-1 übereinstimmten. Zusätzlich wurden die Sequenzen des bovinen und humanen ECE-1a Promotors mit dem Programm *Blast Version BLASTN 2.1.2* verglichen. Schließlich wurden die Positionen dieser Bindungsstellen in das Ergebnis von Blast übertragen, um die evolutionär konservierten und somit für die Regulation des Promotors besonders wichtigen Bindungsstellen herauszufiltern. Die Bezeichnung der ETS-Konsensussequenzen und damit der Oligonukleotide bezieht sich jeweils auf den Abstand der dritten Base in der Kernsequenz (GGA) des ETS-DNA-Motivs vom Translationsstartkodon für ECE-1a.

4.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in Nährmedium (siehe Anhang) in einem Zellinkubator bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, einem Sauerstoffgehalt von 95% sowie einem Kohlendioxidgehalt von 5% kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Bei Konfluenz wurden diese unter Verwendung von Trypsin/EDTA passagiert. BAEC wurden aus Rinderaorten gewonnen. Die Aorten wurden nach Entnahme mit kaltem PBS gespült und in der Sterilbank von Bindegewebe und Fett gereinigt. Danach wurden sie an den Gefäßabgängen aufgeschnitten und in einen Rahmen eingespannt. Nach 20-minütiger Inkubation mit Dispase-Lösung bei 37°C lösten sich die Endothelzellen. Diese wurden mit einem Wattestäbchen aufgenommen, welches man über die Endothelschicht gerollt und anschließend im Medium ausgeschwenkt hat. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 800 U/min (400 g). Das entstandene Pellet wurde in 30 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die zu benutzenden 50 ml Kulturflaschen wurden mit Kollagen A beschichtet. Dazu wurde das Kollagen A mit 0,5xPBS im Verhältnis 1:1 gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert sowie einmalig mit 1xPBS gewaschen und in die Kulturflaschen

eingbracht. Anschließend wurde das resuspendierte Pellet in die Kulturflaschen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag. Die Zellen wurden nach ca. 8 Tagen konfluent. Für Stimulationsversuche mit EA.hy926-Zellen wurden die konfluenten Zellen passagiert und dabei das neue Kulturmedium mit dem Phorbolster Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) versetzt. Dabei wurde auf 1ml Medium 10 ng TPA gegeben. TPA diente zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Kontrollzellen wurden mit 10 ng DMSO (Dimethylsulfoxid) pro ml Medium versetzt. Die Transfektion erfolgte 5-6 Stunden später.

4.3 Extraktion von nukleärem und zytoplasmatischem Protein aus Zellkultur-Zellen

4.3.1 Prinzip

Die Proteinextraktion wurde modifiziert nach Schreiber et al. (Schreiber et al., 1989). Dabei wurden die Zellen zuerst durch einen hypotonen Puffer lysiert und zytoplasmatische Proteine gewonnen. Anschließend wurden die nukleären Proteine durch einen hypertonen Puffer extrahiert.

4.3.2 Durchführung

Zunächst wurden der hypotone Homogenisationspuffer (P1) und der hypertone Kernextraktionspuffer (P2) hergestellt und auf Eis gelagert. Weiterhin wurde das Zellmedium der konfluenten Zellen vorsichtig seitlich abgesaugt und diese mit 25 ml eiskaltem 1xPBS gewaschen. Nach erneuter Zugabe von 10 ml eiskaltem 1xPBS wurden die Zellen mit einem Zellschaber von dem Boden der Kulturflasche gelöst. Die in PBS aufgenommenen Zellen wurden in ein 15 ml-Falcon-Gefäß gegeben und für 8 Minuten bei 800 U/min und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1,5 ml gekühltem, hypotonem Homogenisationspuffer (P1) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur besseren Zellyse wurden 56 µl einer gekühlten 10%igen *IGEPAL CA-630*-Lösung hinzugegeben und die Zellen für 10 s auf dem Vortex-Gerät vermischt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 10000 U/min und bei einer Temperatur von 4°C. Aus dem Überstand konnten die zytosolischen Proteine gewonnen werden. Das Pellet wurde in 1 ml hypotonem Homogenisationspuffer (P1) resuspendiert und ein weiteres Mal für 10 min bei 10000 U/min und bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl hypertone Kernextraktionspuffer (P2) resuspendiert. Bei einer Temperatur von 4°C wurde die Lösung für 30 min

geschüttelt. Anschließend erfolgte eine 30- minütige Zentrifugation bei 13000 U/min und bei einer Temperatur von 4 °C. Der Überstand enthielt lösliche Proteine wie Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine.

4.4 Proteinbestimmung

4.4.1 Prinzip

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem von Bradford et al. entwickelten Prinzip (Bradford et al., 1976). Hierbei handelt es sich um eine für kleine Proteinmengen sensitive photometrische Methode, die nach dem Prinzip der Protein-Farbstoff-Bindung unter Benutzung einer Proteinstandardkurve quantitative Aussagen ermöglicht. Durch die Bindung der dabei verwendeten *BioRad DC-Reagenz* an basische und aromatische AS-Reste in saurem Milieu entsteht ein Farbumschlag. Es wird eine Absorptionsänderung von 465 nm zu einer Wellenlänge von 750 nm induziert, die quantitativ gemessen wird.

4.4.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach dem *BioRad-DC-Protein-Assay-Protokoll*. Zunächst wurde eine Standardreihe mit Konzentrationen von 0 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 – 3,0 mg/ml angelegt. Dabei wurde eine 30%ige BSA-Standardlösung (bovines Serumalbumin) mit Puffer (P1) für zytosolische Proteine oder Puffer (P2) für nukleäre Proteine im entsprechenden Verhältnis gemischt. Es sollte der in der Kernextraktion hergestellte Puffer P1 bzw. P2 verwendet werden. Anschließend wurde *DC Protein Assay Reagent S* mit *DC Protein Assay Reagent A* im Verhältnis 1:50 gemischt. Auf einer Mikrotiterplatte wurden je 5 µl der Probe (BSA-Standard oder zu messende Proteinprobe) mit 25 µl *DC Protein Assay Reagent S/A* und 200 µl *DC Protein Assay Reagent B* zusammenpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT erfolgte die Messung im *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die Probe wurde über die Software *Relevation* ausgewertet.

Protokoll 1:

- *DC Protein Assay Reagent S* zu *DC Protein Assay Reagent A* 1:50 → Reagenz AS
- 5 µl Probe
- 25 µl Reagenz AS
- 200 µl *DC Protein Assay Reagent B*
- ⌚ 15 min Inkubation bei RT

4.5 Gelshift / Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

4.5.1 Prinzip

Durch diese Methode lassen sich spezifische Protein-DNA-Wechselwirkungen aufzeigen. Dabei wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid (ODN), welches optimalerweise eine Länge von 20 bis 200 Basenpaaren enthielt, radioaktiv markiert. Tritt eine Wechselwirkung dieses DNA-Stückes mit z.B. einem Transkriptionsfaktor ein, entsteht ein größerer Komplex, welcher später durch ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgrund seiner Ladungs- und Größeneigenschaften langsamer hindurch tritt. Es entsteht eine charakteristische Bande, die sogenannte *Shiftbande* (siehe Abb. 8A). Um die Spezifität dieser Bande zu zeigen, wurde das gleiche ODN in nicht radioaktiv markiertem Zustand zu dem Ansatz hinzugeben. Dadurch stehen weniger Bindungspartner für die radioaktiv markierten ODN zur Verfügung. Die Bande wird abgeschwächt (siehe Abb. 8B). Um die Bindung eines bestimmten Proteins zu beweisen, gibt man einen spezifischen Antikörper in den Ansatz. Dies führt zu einem noch größeren Komplex, der entsprechend langsamer durch das Gel tritt und eine so genannte *Supershiftbande* bildet (siehe Abb. 8C). Meist erscheint die *Shiftbande* dieses Ansatzes schwächer oder verschwindet idealerweise vollständig. Um störende Hintergrundsignale zu vermeiden, wurde der Ansatz mit unspezifischer DNA gesättigt.

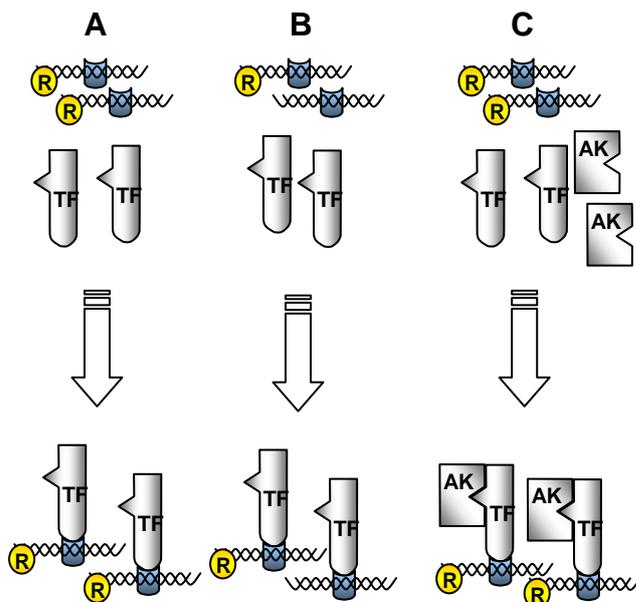


Abbildung 8: R= radioaktive Markierung des ODN, welches mit blauer Bindungs-stelle dargestellt ist, TF= Transkriptionsfaktor, AK= Antikörper. **A:** Bindung des Transkriptionsfaktors an das ODN führt zu einer sichtbaren Bande im Gel. **B:** Inhibition mit unmarkiertem ODN schwächt die Bande im Gel ab. **C:** Durch einen spezifischen Antikörper entsteht ein größerer Komplex, der zu einer *Supershiftbande* führt.

4.5.2 Durchführung

Herstellung der doppelsträngigen Oligonukleotide

Sämtliche doppelsträngige Oligonukleotide wurden als Sense- und Antisense-Einzelstrang-DNA bei der Firma *Genset* bestellt. Um eine Doppelstrang-DNA herzustellen, wurden diese äquimolar zusammenpipettiert und 4 min im Wasserbad gekocht sowie über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Kontrolle der Reassoziations erfolgte anhand der Größe auf einem 1xTBE Agarose-Gel. Zum späteren Gelshift wurden die Oligonukleotide auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ verdünnt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Herstellung des Gels

Zum Guss des Gels wurden zwei Glasplatten aufeinander gelegt, zwischen denen seitlich jeweils *Spacer* mit einer Dicke von 1 mm gelegt wurden. Nach unten hin wurde die Konstruktion mit Klebeband abgedichtet und von allen Seiten mit 9 Klammern zusammengehalten. Es wurde für diese Arbeit grundlegend eine Gelkonzentration von 4,0 % Polyacrylamid benutzt. Nach dem Guss des Gels und einer Polymerisationsphase konnten diese in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Plastikbox bei einer Temperatur von -4°C gelagert werden.

Protokoll 2.1: 4 %iges Polyacrylamidgel

- 5 ml Gel 40 (38 % Acrylamid und 2% Bisacrylamid)
- 10 ml Tris-Glycin (5 x)
- 50 μl TEMED
- 250 μl APS (10 %)
- 35 ml H_2O

Radioaktive Markierung

Der Ansatz wurde nach Protokoll 2.2 in einem Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss gemischt und anschließend inkubiert sowie mit H_2O aufgefüllt. Während des Mischens des Ansatzes wurde auf Eis gearbeitet.

Protokoll 2.2: Radioaktive Markierung

- 2 μl ODN (1 $\mu\text{mol} / \mu\text{l}$)
- 4 μl T4-Kinase-Puffer (10 x)
- 2 μl T4-Kinase
- 28 μl H_2O
- 4 μl [γ - ^{32}P]ATP (40 $\mu\text{Ci} / \mu\text{l}$)

Inkubation

1. 60 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$
 2. 10 min bei $65\text{ }^\circ\text{C}$
- ad 50 μl H_2O

Aufreinigung des Ansatzes

Die Aufreinigung erfolgte anfänglich durch *Sephadex G25 Säulen*, später durch *Microspin G-25 Columns*. Die Säulen wurden auf ein Gefäß gestellt und zentrifugiert, um die Flüssigkeit aus diesen zu entfernen (*Sephadex G25 Säulen* für 3 min bei 2200 g und bei Raumtemperatur bzw. *Microspin G-25 Säulen* für 1 min bei 3000 g und Raumtemperatur). Anschließend wurden die Säulen auf ein neues Gefäß gestellt und der Ansatz direkt hinein gegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation (*Sephadex-G25 Säulen* für 4 min bei 2200 g und Raumtemperatur bzw. *Microspin G-25 Säulen* für 2 min bei 3000 g und Raumtemperatur). Im Gefäß befand sich das aufgereinigte, radioaktiv markierte ODN.

Messung

Im Szintillationszähler wurden jeweils 5 µl des Eluats gemessen. Für die Bindungsreaktion wurde eine Konzentration von 60000 cpm/µl eingesetzt.

Bindungsreaktion

Die Bindungsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur. Als Kompetitor wurde das gleiche, aber nicht radioaktiv markierte, ODN eingesetzt. Wenn Antikörper in den Ansatz gegeben wurde, folgte eine Inkubationszeit für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Protokoll 2.3.1: Bindungsreaktion

- 10 µg Kernproteinextrakt
 - x µl Kompetitor (10:1 bzw. 100:1 bzw. 1000:1)
 - 6 µg Antikörper
- ad 10µl H₂O
- ⌚ 60 min Inkubation bei RT

Anschließend wurde ein Mastermix hergestellt, der radioaktiv markiertes ODN enthielt und zu dem Ansatz hinzugegeben wurde (siehe nächste Seite Protokoll 2.3.2). Es erfolgte eine weitere Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur.

Protokoll 2.3.2: Mastermix

- 2 μ l unspezifische DNA (poly [d(I-C)], 1 μ g/ μ l)
 - 0,5 μ l DTT (0,05 M)
 - 0,5 μ l MgCl₂ (0,05 M)
 - 5 μ l 5xBindungspuffer
 - x μ l radioaktiv markiertes ODN
- ad 15 μ l H₂O
- ⌚ 60 min Inkubation bei RT

Gelelektrophorese

Als Laufpuffer wurde 1xTris-Glycin verwendet. Um das Gel vorher zu elektrophorieren, wurde ein Vorlauf bei 350 V, 30 mA und 900 W für 30 min durchgeführt. Anschließend erfolgte die eigentliche Elektrophorese mit dem endgültigen Ansatz bei 350 V, 30 mA und 900. Die Laufzeit war hierbei variabel.

Protokoll 2.3.3: Endgültiger Ansatz

- 10 μ l Bindungsreaktion
- 15 μ l Mastermix
- 5 μ l Gelbeladungspuffer

Darstellung der Ergebnisse

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten entfernt und das Gel auf 3 MM Whatman-Filterpapier gedrückt. Dieses wurde dreimal mit Saranfolie eingewickelt und zusammen mit einer Phosphorimagerplatte in eine Autoradiographiekassette für ca. 7 Tage bei -20 °C eingeschlossen. Anschließend konnte die Kassette im Phosphorimager BAS-1500-Gerät ausgewertet werden.

4.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.6.1 Prinzip

Die PCR ist ein gentechnologisches Verfahren zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, welches erstmals 1984 von Mullis et al. beschrieben wurde. Die DNA wurde durch Hitze zunächst denaturiert, so dass sie in Einzelsträngen vorlag. Anschließend konnten sich bei einer entsprechenden *Annealing*temperatur der *sense*- und *antisense*-Primer anlagern. Die DNA wurde mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert. Durch mehrmaliges Wiederholen dieses Vorgangs man einen exponentiellen Anstieg der DNA-Menge erreichen.

4.6.2 Durchführung

Die *Annealing*temperatur für Oligonukleotide wurde nach Wu (Wu et al., 1991) wie folgt berechnet :

$$T_p = 22 + 1,46 (2 \times (\text{Anzahl von G oder C}) + (\text{Anzahl von A oder T}))$$

Als DNA-Polymerase wurde ausschließlich Pfu-Polymerase aufgrund der größeren Fehlergenauigkeit verwendet.

Protokoll 3.1: PCR-Ansatz

- 2,5 µl 10x PCR-Puffer
- 0,5 µl dNTP's (10 mM)
- 1,0 µl Primer A (10 µM)
- 1,0 µl Primer B (10µM)
- 1,0 µl *Template* (100 pg/µl)
- 18,5 µl H₂O
- 0,5 µl Pfu-Polymerase (2,5 U)

Protokoll 3.2: PCR-Schritte

1. Denaturierung der DNA: 95°C 3 Minuten
2. *Annealing*temperatur : variabel 45 Sekunden
3. Synthesetemperatur : 74°C 1 Minute
4. Denaturierung : 95°C 30 Sekunden
5. Zyklenanzahl : Wiederholung der Schritte 2- 4 : 35 x
6. Abschlußsynthese : 74°C 5 Minuten
7. Abkühlung : 15°C 10 Minuten

4.7 Einbringen von Punktmutationen

4.7.1 Prinzip

Die Punktmutationen wurden über mutierte Primer eingefügt, welche bei einer Länge von ca. 20 Basenpaaren und einer mutierten Base ausreichende Bindungseigenschaften aufwiesen. Hierzu wurde das ETS-Kernmotiv GGAA in die Sequenz GGCA umgewandelt. Es konnte bereits durch Gelshiftanalyse (EMSA) gezeigt werden, dass Ets-1 und andere ETS-Proteine an eine solche Sequenz nicht mehr binden können (Dissertation A. Günther, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin, 2002; Orzechowski et al., 1998). Im ersten Schritt wurden parallel PCR1a und PCR1b durchgeführt und in einer zweiten PCR zusammengegeben (Darstellung in Abb. 9).

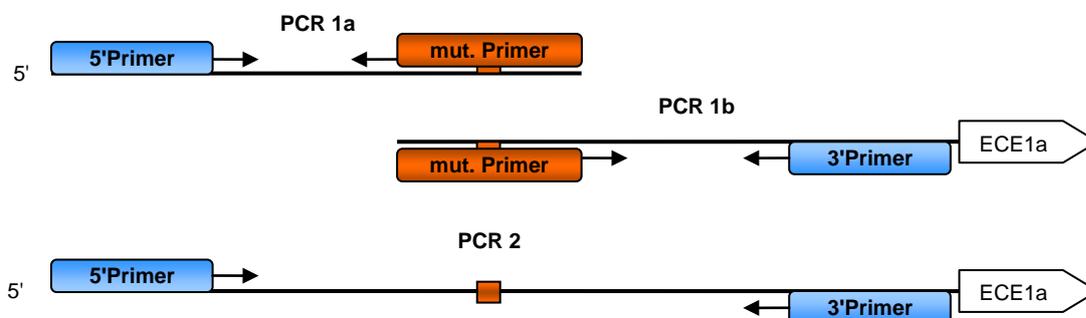


Abbildung 9: Herstellung einer Deletionsmutante, schematische Darstellung des ECE1a-Promotors. Roter Kasten: Mutation im Ets-Bindungsmotiv mit der Sequenz GGCA.

4.7.2 Durchführung

PCR 1a, PCR 1b, sowie PCR 2 wurden nach dem oben dargestellten Protokoll 3.1 und 3.2 durchgeführt (Higuchi et al., 1988). Die PCR-Ansätze wurden zur Kontrolle auf einem Agarose-Gel mit 1xTBE aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe wurde ein entsprechender DNA-Längenstandard benutzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden beurteilt und photographiert werden. Die Ansätze von PCR 1a und 1b wurden schließlich zusammengegeben und als PCR2 durchgeführt. Das Produkt wurde mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* nach den Herstellerangaben aufgereinigt. Im weiteren Verlauf wurde das mutierte DNA-Fragment in einen Vektor kloniert (siehe nächster Abschnitt „Klonierung“). Die Bezeichnung der Mutation erfolgte nach dem Abstand der mutierten Base zum 3' ATG des jeweiligen Promotors.

4.8 Klonierung

4.8.1 Prinzip

Um die Aktivität des ECE1a Promotors nach dem Einfügen von Mutationen überprüfen zu können, wurden die DNA-Fragmente in einen *Luciferasereportervektor* kloniert. Ein Reportervektor ist ein Plasmid, welches unter anderem für eine *Luciferase* kodiert. Die Stärke der Synthese der *Luciferase* hängt von dem vorgeschalteten Promotorfragment ab, welches in den Vektor kloniert worden ist. Die quantitative Messung der Aktivität erfolgte schließlich mittels einer enzymatischen Reaktion nach Protokoll 5.1 bis 5.3 (siehe unter Transfektion).

Das zu untersuchende DNA-Fragment wurde in den zuvor linearisierten Vektor mittels einer DNA-Ligase unter Bildung einer Phosphodiesterbindung eingebracht. Dieser Vorgang wird als *Ligation* bezeichnet. Das eingebrachte Fragment bezeichnet man als *Insert*. Um das Insert in großer Quantität zu erzeugen, wurde das Plasmid in dafür kompetente eukaryonte Zellen überführt. Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit von Bakterien, Plasmide aufzunehmen. Dieser Vorgang wird als *Transformation* bezeichnet.

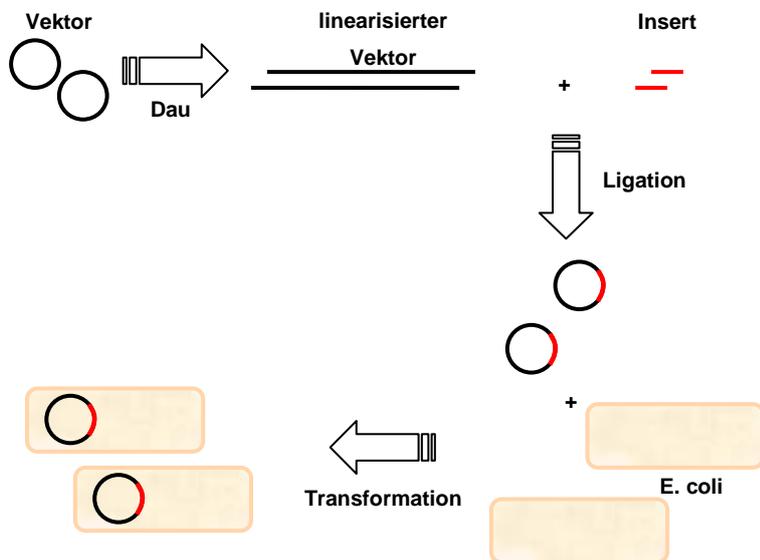


Abbildung 10: Prinzip der Subklonierung eines PCR-Fragmentes in einen Vektor und anschließende Transformation in *DH5α E. coli*

4.8.2 Durchführung

Linearisierung

Zunächst wurde der Vektor *pGL3-Basic* nach Protokoll 4.1 mit dem Enzym *Sma* linearisiert. Die vorangegangene PCR, sowie das Produkt von Protokoll 4.1 wurden

mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* nach den Herstellerangaben aufgereinigt.

Protokoll 4.1: Dau des pGL3Basic-Plasmids

- 2 µg pGL3-Vektor
- 1 µl *Sma*
- 2 µl Puffer
- ⌚ 4 h Inkubation, RT

Der Dau wurde zur Kontrolle neben einem entsprechenden DNA-Längenstandard auf einem 1xTBE Agarose-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht beurteilt.

Ligation

Anschließend erfolgte die Ligation nach Protokoll 4.2. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurde die Ligation mit einem Enzym, welches durch die Klonierung in der multiplen *Kloningsite* des Vektors verloren gegangen war, nachgedaut (Protokoll 4.3). Dadurch wurden alle Plasmide linearisiert, die kein Insert enthielten. Linearisierte Plasmide wurden von kompetenten Zellen schlechter aufgenommen.

Protokoll 4.2: Ligation

- 1 µl linearisierter Vektor *pGL3-Basic*
- 7 µl PCR-Produkt
- 1 µl T4-DNA-Ligase
- 1 µl 10x Puffer
- ⌚ Inkubation über Nacht, 4°C
- ⌚ Inaktivierung der Ligase, 10 min, 70°C

Protokoll 4.3: Nachdau

- 8 µl Ligationsansatz
- 1 µl *Mlu* I
- 1 µl NE Puffer 3
- ⌚ 3 h Inkubation, 37°C

Transformation

Zur Transformation wurden kompetente Zellen vom Typ *DH5α E. coli* verwendet.

Protokoll 4.4: Transformation

- 1 µl Nachdau bzw. 10 ng Plasmid-DNA
- 50 µl *DH5α E.coli*
- ⌚ 30 min auf Eis
- ⌚ 20 sek, 37°C
- ⌚ 2 min auf Eis

Vermehrung des Plasmids

Zum Ansatz wurden 950 µl *LB-Medium* hinzugegeben und *LB-Platten* mit den Zellen beimpft. Die Platten wurden für 24 - 48 Stunden bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, einem Sauerstoffgehalt von 95% sowie einem Kohlendioxidgehalt von 5% inkubiert. Eine weitere Auslese der Zellen erfolgte dadurch, dass der Agarboden bzw. das Medium mit Ampicillin versetzt war. Durch die Plasmide wurde nur den transformierten Zellen die Möglichkeit zur β-Lactamase-Bildung gegeben und nur diese waren in der Lage zu überleben.

Nach Inkubation wurden entsprechend Kolonien in 5 ml Medium überführt. Zur Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* verwendet. Die Kontrolle der richtigen Ausrichtung des Inserts wurde anschließend im Dau und mit Anfertigung eines Agarose-Gels überprüft. Die das Insert enthaltenen Zellen wurden schließlich nach Herstellerangaben in ein größeres Volumen überführt und mit dem *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* isoliert und aufgereinigt. Im letzten Schritt erfolgte die Sequenzierung des Inserts durch das automatisierte DNA-Sequenziergerät *ABI Prism™ 377 DNA Sequencer*, um sowohl die Lage des Inserts als auch die richtige Basenabfolge und damit den Erfolg der Klonierung sicherzustellen.

Messung der DNA-Konzentration

Die Messung erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte (OD). Die Proben wurden mit H₂O ausreichend verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm für die OD der Nukleinsäuren bzw. bei einer Wellenlänge von 280 nm für die OD von Protein gemessen. Der Quotient OD_{260nm} / OD_{280nm} gab die Reinheit der DNA an. Dieser sollte zwischen 1,65 und 2,2 liegen. Die Konzentration der DNA berechnet sich nach folgender Formel :

$$[DNA]_{\mu\text{g} / \mu\text{l}} = \frac{OD_{260} * \text{Verdünnung} * \text{Absorptionsfaktor}}{1000}$$

Der Absorptionsfaktor für DNA beträgt 50.

4.9 Transfektion

4.9.1 Prinzip

Unter Transfektion versteht man das Prinzip, fremde DNA, z.B. eine Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen einzuschleusen und sie in deren Zellkern zur Transkription zu bringen. Dabei wurde auf *Dual-Luciferase Reporter Assay System* von *Promega* zurückgegriffen. Durch die hier verwendete Lipidlösung *FuGene™* bilden sich Lipid-DNA Komplexe, die von den Zellen endozytotisch in das Zytoplasma aufgenommen werden können. Von dort gelangen sie durch die Kernporen in den Zellkern und können dort transkribiert werden. Für sämtliche Plasmide wurde der *pGL3-Basic* Vektor von *Promega* verwendet, der eine *Firefly-Luciferase*-Sequenz enthielt. Um die *Luciferase*aktivität durch Elimination unterschiedlicher Transfektionseffizienzen zu standardisieren, wurde in einem Ansatz jeweils ein Vektor mit *Renilla-Luciferase* als Kontrolle kotransfiziert und schließlich der Quotient aus *Firefly-Luciferase/Renilla-Luciferase* gebildet. Um verschiedene Messungen standardisieren zu können, wurden pro Versuch einmalig die Aktivität des *pGL3-Basic* Vektor gemessen und alle anderen Messdaten relativ darauf bezogen. *Firefly-Luciferase* und *Renilla-Luciferase* setzen jeweils verschiedene Produkte in einer Oxidationsreaktion um, bei der zusätzlich Licht entsteht. Die *Luciferase*aktivität wurde in 20 µl Lysat über 20 s in einem *Lumat LB 9501 Luminometer* quantitativ gemessen.

4.9.2 Durchführung

Vorbereitung

Das Protokoll wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden vor Transfektion mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Loch in 12-Loch-Platten eingesät. 24 Stunden vor Transfektion erfolgte ein Medienwechsel. Dadurch wurde zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 50 - 80 % erreicht.

Plattenbelegung

Die insgesamt transfizierte DNA-Menge betrug pro Loch 0,45 µg (0,4 µg Expressionskonstrukt und 0,05 µg *Renilla-Luciferase* Konstrukt). Für Kotransfektionsversuche wurden 0,1 µg Ets-1 Expressionskonstrukt bzw. *pCR3.1* pro Loch eingesetzt.

Protokoll 5.1: Plasmidmix / Loch

- 0,4 µg Expressionskonstrukt
- (0,1 µg kotransfiziertes Expressionskonstrukt)
- 0,05 µg *Renilla-Luciferase*
- ad n µl *Optimem*

Nach Herstellerangaben wurde eine Konzentration von 3 µl *FuGene™* : 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

Protokoll 5.2: *FuGene™*-Mastermix pro Loch

- 1,5 µl *FuGene™*
- 50 - 1,5 - n µl *Optimem*
- ⌚ 5 min Inkubation bei RT

Protokoll 5.3: Pro Loch

- n µl Plasmidmix
- 50 - n µl *FuGene™*-Mastermix
- ⌚ 15 min Inkubation bei RT

Nach 15 Minuten Inkubation wurde das Medium von der Platte abgesaugt und 50 µl des Plasmid - *FuGene™* - *Optimem* - Gemisches tropfenweise pro Loch auf die Zellen gegeben. Diese wurden 48 Stunden in einem Zellinkubator bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem Sauerstoffgehalt von 95% sowie einem Kohlendioxidgehalt von 5% kultiviert.

Zellernte und Messung

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und mit 200 µl 1xPassive Lysis Buffer von *Promega* lysiert sowie 15 min leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Platten in Saran-Folie eingewickelt und die Zellen für zwei Stunden bei -80°C schockgefroren.

Zur Messung wurden die Platten aufgetaut. 100 µl *LAR II* Reagenz wurden in ein Röhrchen vorgelegt und 20 µl des Lysats hinzugegeben. Es erfolgte die Messung der *Firefly-Luciferase*. Nach Zugabe von *Stop & Glo* Reagenz wurde die *Renilla-Luciferase* gemessen.

4.9.3 Statistik

Die Transfektionseffizienz wurde durch die Kotransfektion mit einem *Renilla-Luciferase* Konstrukt in jedem Loch standardisiert. Jedes Expressionskonstrukt wurde mit $n = 3$ bzw. $n = 4$ Ansätzen durchgeführt. Jeder Gesamtversuch wurde noch einmal wiederholt.

Statistische Analyse

Die Daten wurden mit einem zweiseitigen *Student's t-Test* für unverbundene Stichproben analysiert. In allen Transfektionsstudien wurde die Signifikanz zwischen dem ersten Konstrukt und jeweils den anderen Konstrukten in den Abbildungen überprüft. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde Signifikanz angenommen. Nicht signifikant unterschiedliche Werte sind im Ergebnisteil mit n.s. gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurden mittels computerbasierter Analysen evolutionär konservierte ETS-Bindungsstellen im ECE-1a Promotor herausgefiltert. Basierend auf den Ergebnissen der Computeranalyse wurden im zweiten Schritt die Oligonukleotide synthetisiert. Die konkreten Sequenzen sind im Anhang dargestellt. Im nächsten Schritt wurden die Protein-DNA Interaktionen der einzelnen Konsensussequenzen mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) untersucht und bei Nachweis die Proteinbindung funktionell untersucht. Hierzu wurden die Oligonukleotide, wie im Abschnitt 4.7 mutiert und deren Bindungsverhalten in transfizierten Endothelzellen untersucht und mit dem Verhalten der jeweiligen Wildtypsequenzen verglichen.

5.1 Computerbasierte Analyse

Das Ergebnis der computerbasierten Analyse putativer ETS-Bindungsstellen im bovinen und humanen ECE-1a Promotor (siehe Abschnitt 4.1) ist in Abbildung 11 dargestellt. Die evolutionär konservierten Bindungsstellen sind jeweils als blaue Boxen dargestellt.

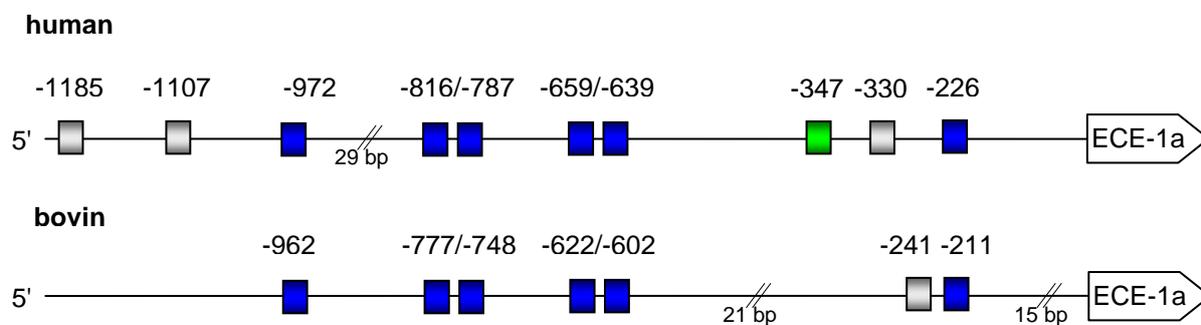


Abbildung 11: Computerbasierte Analyse der Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im humanen und bovinen ECE-1a Promotor. Konsensussequenzen von ETS Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wurden identifiziert unter Benutzung von MatInspector Release professional 6.2.2 software und MatInspector library: Matrix Family Library vers. 3.3 (core and matrix similarities= 0.9 ausser Motiv -330). Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Bindungsstellen für Ets-1 zwischen humaner and boviner Spezies dar. Graue Boxen stellen weitere Bindungsstellen für Ets-1 dar. Die grüne Box kennzeichnet putative ETS-Konsensussequenz an Position -347, die nicht bestätigt werden konnte. Durchgestrichene Linien markieren nicht-konservierte Regionen.

5.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

5.2.1 Das Ets-1-Konsensusmotiv

Das in diesem Versuch benutzte ODN cEts-1 (siehe Anhang - Materialien) enthält genau die Nukleotidsequenz, für die in der Literatur eine Bindung von Ets-1 experimentell gezeigt wurde (Hultgardh-Nilsson et al., 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in TPA-stimulierten EA.hy926-Zellen eine DNA-Bindung von Ets-1 an dieses Oligonukleotid stattgefunden hat, jedoch wurde nur eine schwache *Supershift*-Bande detektiert (Orzechowski et al., 2001). Weiterhin wurde eine starke Aktivierung des Promotors durch Mutation der Bindungsstelle -639 beobachtet. Daher wurde ein ähnlicher Versuch in dieser Arbeit noch einmal mit einem ETS-Antiserum wiederholt, welches nicht spezifisch für den Transkriptionsfaktor Ets-1 ist, sondern auch andere Proteine der ETS-Familie wie Ets-2 und GABP detektiert (J. Hagman, persönliche Mitteilung). Als Negativkontrollen wurde eine polyklonale IgG-Fraktion verwendet (siehe Anhang) bzw. ein ODN ohne ETS-Konsensussequenz kreiert, indem eine zufällige Sequenz erstellt wurde (ETS-negativ, siehe Anhang). Da bereits durch Gelshiftanalyse (EMSA) gezeigt werden konnte, dass zytoplasmatische Proteine von EA.hy926-Zellen nicht an das ODN cEts-1 binden, wurde in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf nukleäre Proteine gerichtet (Orzechowski et al., 2001). In einem Gelshift wurden dabei stets TPA-stimulierte EA.hy926-Zellen mit nicht-stimulierten DMSO Kontrollzellen verglichen. Um Verunreinigungen auszuschließen, wurde jeweils eine Geltasche nur mit Farbstoff beladen.

In Abb. 12 (siehe nächste Seite) wurde in den Spuren 1 bis 7 und 9 das ODN cEts-1 benutzt und in der Spur 8 das ODN ETS-negativ. Es ließen sich sechs Banden unter Benutzung des ODN cEts-1 (B1-B5 und U) erkennen. Dabei zeichnete sich die Bande B2 am deutlichsten ab. Die Bande U ließ sich weder durch 10fache, noch durch 1000fache Kompetition aufheben oder in der Intensität verringern. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Protein-DNA-Interaktion. Alle anderen Banden B1 bis B5 ließen sich sowohl in den ersten drei Spuren, die mit nicht stimulierten EA.hy926-Kontrollen (DMSO) beladen wurden, als auch in den Spuren 4 bis 6, die mit TPA-stimulierten EA.hy926 beladen wurden, kompetieren. Damit konnte bewiesen werden, dass die Banden B1 bis B5 alle spezifisch sind. Die Banden B1 bis B5 zeichneten sich in den Spuren 4 bis 6 deutlicher ab, als in den Spuren 1 bis 3. In der Spur 7 ließ sich zwar die volle Intensität der Bande B2 erkennen, aber kein *Supershift* durch Zugabe des Kontroll-Antiserums. In der Spur 9 wurde das ETS-

Antiserum hinzugegeben. Man konnte deutlich einen *Supershift* (S) sehen, der durch den größeren Komplex im Gel nicht so weit lief wie die anderen Protein-DNA-Komplexe. Außerdem hatte in Spur 9 die Bande B2 eine deutlich schwächere Intensität als in Spur 7, was zusätzlich daraufhin deutet, dass genau diese DNA-Komplexe vom Antikörper detektiert wurden.

Da der *Supershift* mit rekombinant hergestelltem Ets-1 Protein erzielt wurde, konnte Ets-1 als Bindungspartner für das ODN cEts-1 bestätigt werden. Auf die Bedeutung der Banden B1 bis B5 wird später in der Diskussion detailliert eingegangen.

Die Spur 8 stellte die Reaktion aus Kontrollzell-Extrakt (DMSO), ODN ETS-negativ und ETS-Antiserum dar. Man konnte keinen *Supershift* erkennen. Auch die Banden B6* und B7* liefen auf einer anderen Höhe als die Banden 1 bis 5 und stellen somit keine ETS-Proteine dar.

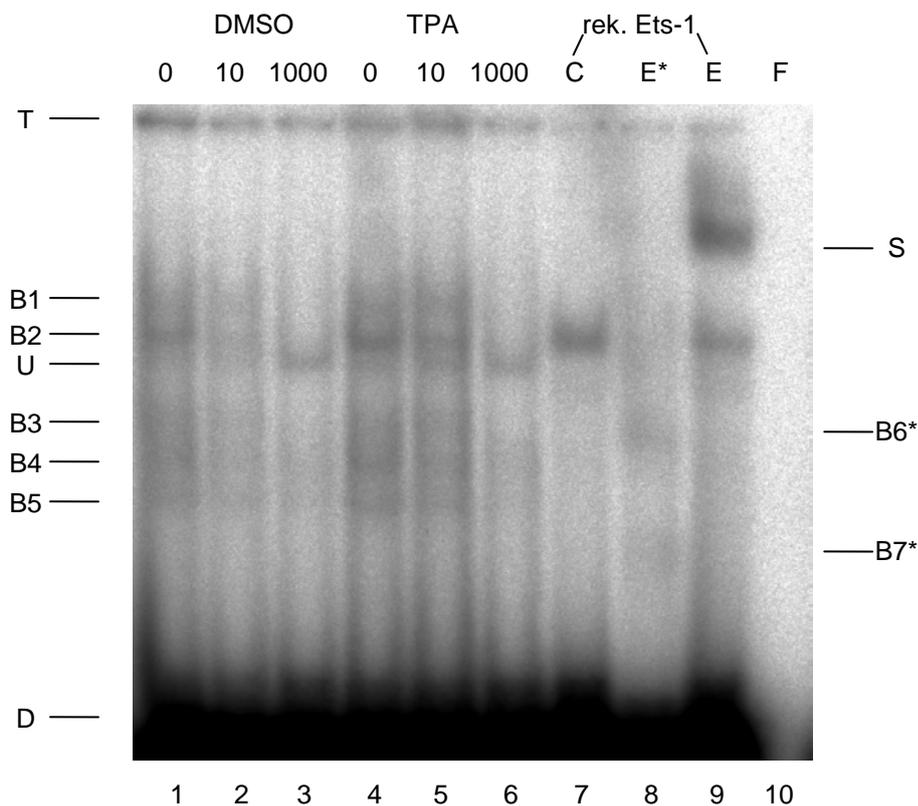


Abbildung 12: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen sowie rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in den Banden B1-B5, U bezeichnet eine unspezifische Bande. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Kompetition erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN cEts-1 mit den Konzentrationen 10 und 1000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum. E* beinhaltet ein ODN ohne ETS-Konsensussequenz und ETS-Antiserum mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen. Die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

5.2.2 Das putative ETS-Motiv -347 im humanen ECE-1a Promotor

Zu Beginn dieser Arbeit wurde im humanen ECE-1a Promotor die Sequenz bei -347 per computerbasierter Analyse als potentielle ETS-Bindungsstelle nur im humanen Promotor identifiziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in EA.hy-Zellen exprimierte ETS-Proteine nicht in der Lage sind, an diese DNA-Sequenz zu binden. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

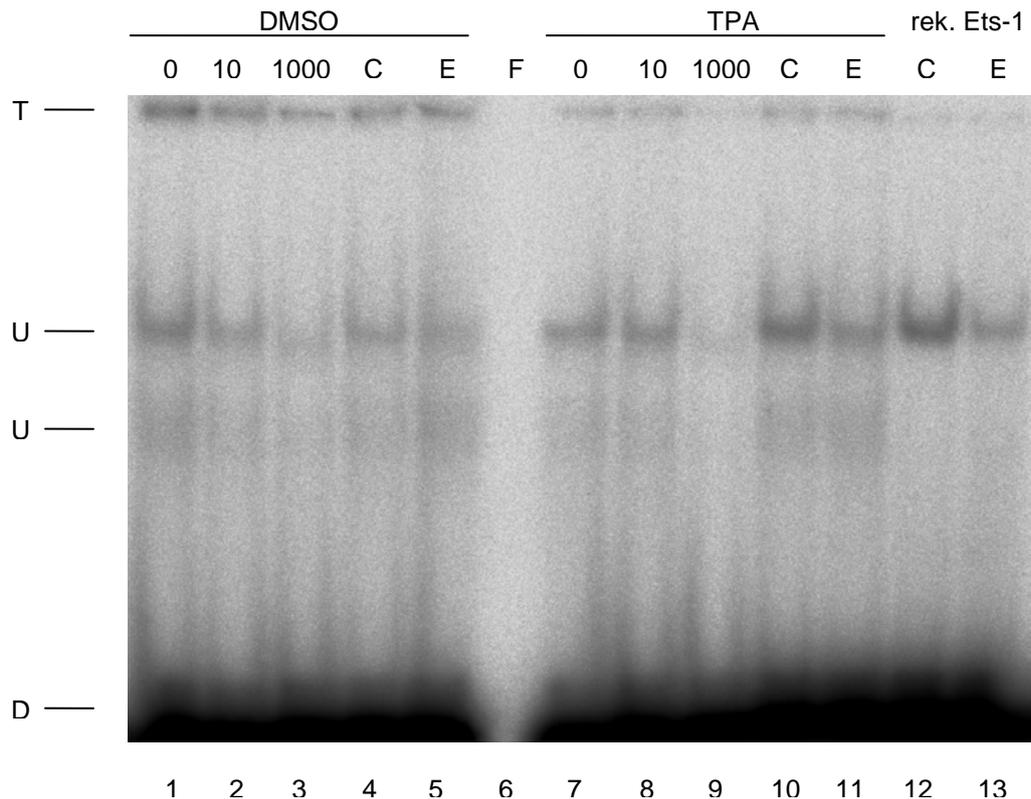


Abbildung 13: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen sowie rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. U bezeichnet eine unspezifische Bande. D bedeutet freie DNA. Die Kompetition erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN-347 mit den Konzentrationen 10 und 1000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Durch alle beladenen Spuren zogen sich zwei Banden (U) mit etwas wechselnder Intensität. Dabei waren sie jedoch in den Spuren 3 und 9 immer noch zu sehen, obwohl dort zusätzlich eine Kompetition mit 1000fachem nicht radioaktiv markiertem ODN -347 erfolgte. Dies deutete daraufhin, dass die Bande unspezifisch ist. Die Bande U in den Spuren 3 und 9 war zwar etwas schwächer als in den Spuren 1 und 2 bzw. 7 und 8, doch war die Beladungsintensität (T) in den Spuren 3 und 9 äußerst schwach und es bestand ein starker Überschuss des Kompetitors, der das ODN verdünnte, so dass man weiterhin nicht von einer spezifischen Bande ausgehen

konnte. Ein *Supershift* zeigte sich weder in der Spur 5 mit nukleären Kernextrakten aus EA.hy926-Kontrollen (DMSO), noch in der Spur 11, die mit TPA-stimulierten EA.hy926 beladen war, und auch nicht in der Spur 13 mit rekombinantem Ets-1.

5.2.3 Das ETS-Motiv -226 im humanen ECE-1a Promotor

Die Sequenz des ETS-Motivs im humanen ECE-1a-Promotor bei -226 ist evolutionär konserviert und homolog zum ETS-Motiv bei -211 im bovinen Promotor. In Abb. 14 ist die Gelshiftanalyse (EMSA) dargestellt.

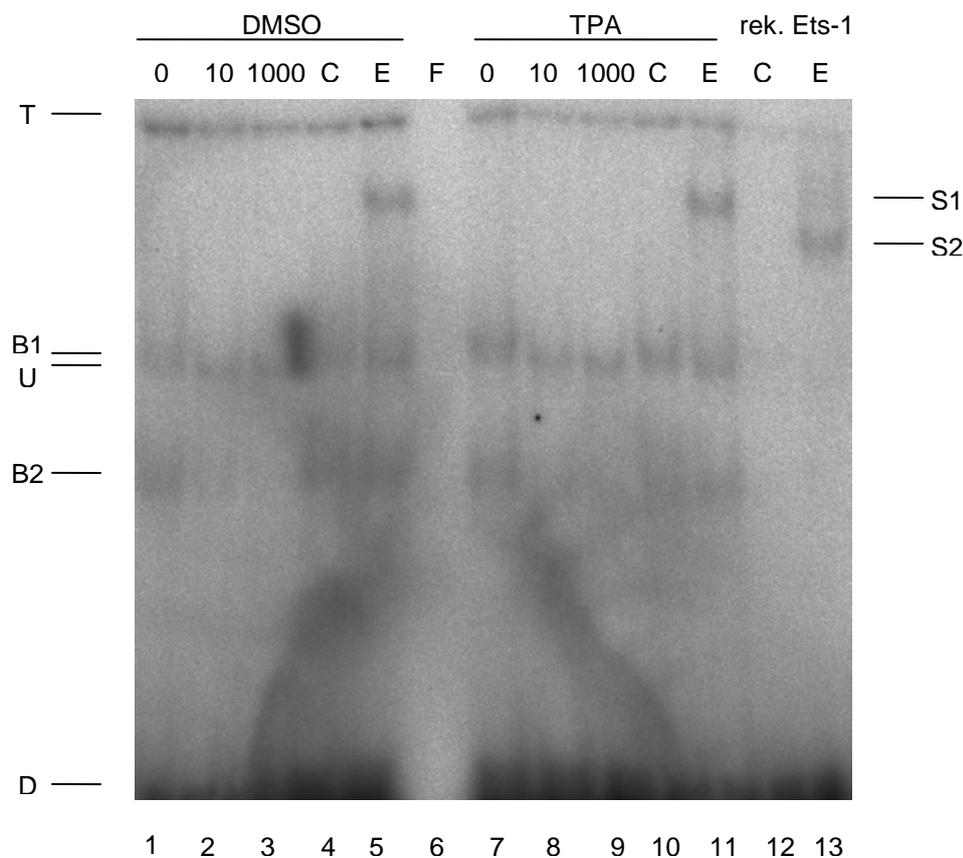


Abbildung 14: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen sowie rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in den Banden B1-B2. U bezeichnet eine unspezifische Bande. S1 und S2 bezeichnen eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Konkurrenz erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -226 mit den Konzentrationen 10 und 1000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Dargestellt sind in den Spuren 1 bis 5 nukleäre Kernextrakte von EA.hy926-Kontrollen (DMSO) sowie in den Spuren 7 bis 11 nukleäre Kernextrakte von TPA-stimulierten EA.hy926. Die Konkurrenz erfolgte mit 10facher und 1000facher Konkurrenz in den Spuren 2 und 3 bzw. 8 und 9.

Es ließen sich insgesamt zwei *Shift*banden (B1, B2), zwei *Supershift*banden (S) und eine unspezifische Bande (U) erkennen. Dabei ließ sich die mit U gekennzeichnete

Bande nicht kompetieren und ist somit als unspezifisch einzustufen. Die Banden B1 und B2 waren in den Spuren 2 und 3 bzw. 8 und 9 kompetierbar und somit spezifisch. Mit DMSO und TPA versetzte Kernextrakte ergaben ungefähr ein gleich starkes Signal (Spuren 4 bis 6 versus Spuren 1 bis 3). Sowohl in Spur 5 als auch in Spur 11 gelang ein *Supershift* mit ETS-Antiserum. In Verbindung mit den spezifischen *Shift*banden der Spuren 4 bis 6 und 1 bis 3 ließ sich daher schlussfolgern, dass ein ETS-Protein aus den Kernextrakten unter basalen Bedingungen und unter Stimulationsbedingungen an dieses Oligonukleotid binden kann. Die *Shift*bande war in den Spuren 12 und 13 nicht zu sehen. Dies war am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Beladungsintensität dieser beiden Spuren auch sehr niedrig war, da sonst keine *Supershift*bande entstanden wäre. In Spur 13 mit rekombinantem Ets-1 ließ sich deutlich eine *Supershift*bande erkennen, die etwas weiter unten lag als in den Spuren 5 und 11. Bei genauer Betrachtung fiel jedoch auf, dass bereits weiter oben eine schwache Bande detektiert wurde, die auf gleicher Höhe der *Supershift*banden aus Kernextrakten begann. Diese Beobachtung wiederholte sich in allen weiteren Gelshiftuntersuchungen. In der Diskussion wird näher darauf eingegangen. Da mit rekombinantem Ets-1 ein eindeutiger *Supershift* induziert wurde, konnte gezeigt werden, dass Ets-1 an das ETS-Motiv -226 binden kann.

5.2.4 Die ETS-Motive -639 und -659 im humanen ECE-1a Promotor

Diese beiden potentiellen Bindungsstellen für ETS-Proteine liegen tandemartig in einer Region, die homolog im bovinen Promotor zu finden ist und dort in einer für die Regulation entscheidenden Region liegt (siehe unter Abschnitt 5.3.1, Abb. 24).

Das ETS-Motiv -639 im humanen ECE-1a Promotor

In Abb. 15 sieht man die erfolgreiche Competition in den Spuren 2, 7 und 11 mit einem 1000fachen Überschuss an nicht radioaktiv markiertem ODN -639. Dort war die Bande B1 jeweils komplett verschwunden. Die Bande B1 ist somit spezifisch. In Spur 2 ließ sich knapp unterhalb der Bande B1 eine weitere Bande detektieren, die nicht ganz verschwand und somit als unspezifisch einzustufen ist (mit U gekennzeichnet).

Die Negativkontrollen mit dem Kontroll-Antiserum in den Spuren 3 und 8 ergaben keine *Supershift*bande. In den Spuren 4, 9 und 13 wurde das ETS-Antiserum hinzugegeben. Man konnte in jeder dieser Spuren eine deutliche *Supershift*bande

darüber lag, in den Spuren 2 und 7 vollständig verschwunden. Dies ließ den Schluss zu, dass die Bande B2 spezifisch ist und die Bande U durch eine unspezifische Bindung hervorgerufen wurde. Auch die Banden B1 und B3, die sich sehr schwach darstellten, waren bei genauer Betrachtung durch die Konkurrenz mit nicht radioaktiv markiertem ODN -659 vollständig verschwunden und somit spezifisch.

Die Negativkontrollen mit Kontroll-Antiserum in den Spuren 3 und 8 zeigten keine *Supershift*bande (S), während Dieses in den Spuren 4 und 9 mit ETS-Antiserum gelang. Auch unter Benutzung von rekombinantem Ets-1 ließ sich eine *Supershift*bande in der Spur 11 erkennen. Hier schien dieser Komplex wieder kleiner zu sein als bei der Protein-DNA-Interaktion von einem ETS-Protein aus nukleären Extrakten von EA.hy926-Zellen mit dem ODN -659.

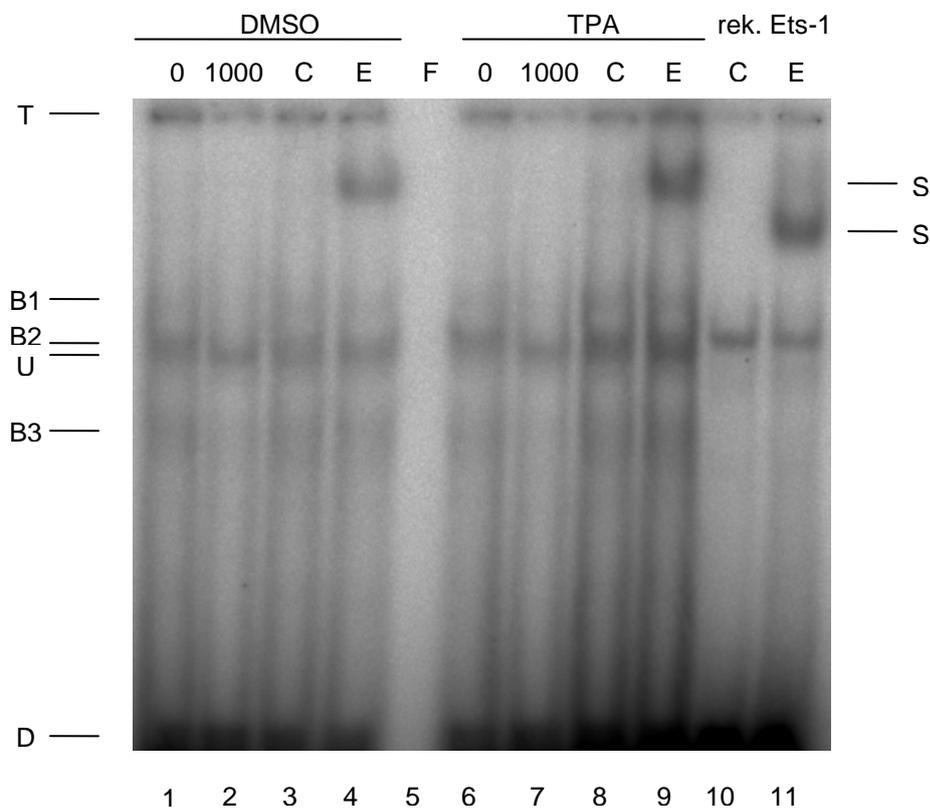


Abbildung 16: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen sowie rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in den Banden B1-B3, U bezeichnet eine unspezifische Bande, S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Konkurrenz erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -659 mit der Konzentration 1000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Aufgrund der nachgewiesenen spezifischen Banden B1 bis B3 und der *Supershift*banden bei Einsatz von ETS-Antiserum konnte man eindeutig schlussfolgern, dass ein ETS-Protein an die Sequenz des ODN-659 gebunden hat.

Rekombinant hergestelltes Ets-1 bildete ebenfalls eine *Supershift*bande. Somit konnte gezeigt werden, dass auch Ets-1 in der Lage ist, an das ODN -659 zu binden.

Die ETS-Motive -639 und -659 in Kombination

Da sich in den Transfektionsuntersuchungen herausgestellt hatte, dass die ETS-Motive -639 und -659 funktionell unterschiedlich waren, wurden die beiden ODN in einem Versuch direkt nebeneinander gestellt. Die Darstellung erfolgt in Abb. 17.

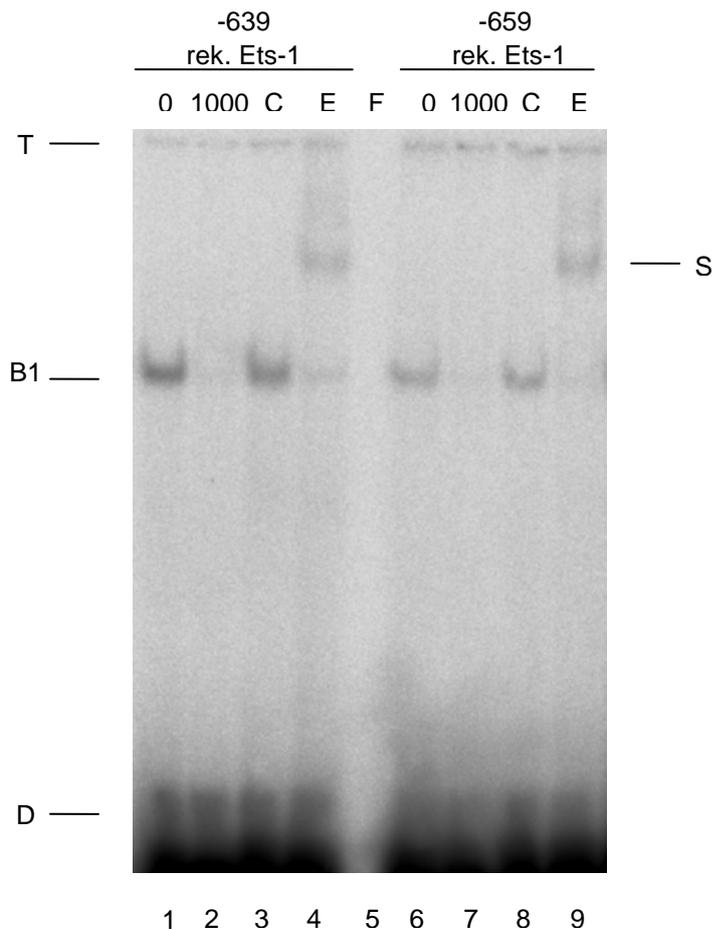


Abbildung 17: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit rekombinatem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in der Bande B1. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Konkurrenz erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -639 sowie ODN -659 mit der Konzentration 1000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Die Spezifität der Bande B1 zeigte sich dadurch, dass diese durch eine Konkurrenz mit einer 1000fachen Konzentration von nicht radioaktiv markiertem ODN -639 in der Spur 2 bzw. ODN -659 in der Spur 6 völlig aufhebbar war. Die *Supershift*banden in den Spuren 4 und 9 waren auf der gleichen Laufhöhe im Gel zu sehen. Die Intensität der Bindungen an das ODN -639 war höher, als die Bindungen an das ODN -659.

Dies könnte daraufhin deuten, dass die Bindungsaffinität vom Protein Ets-1 zum ODN -639 größer ist als zum ODN -659.

5.2.5 Das ETS-Motiv -787 im humanen ECE-1a Promotor

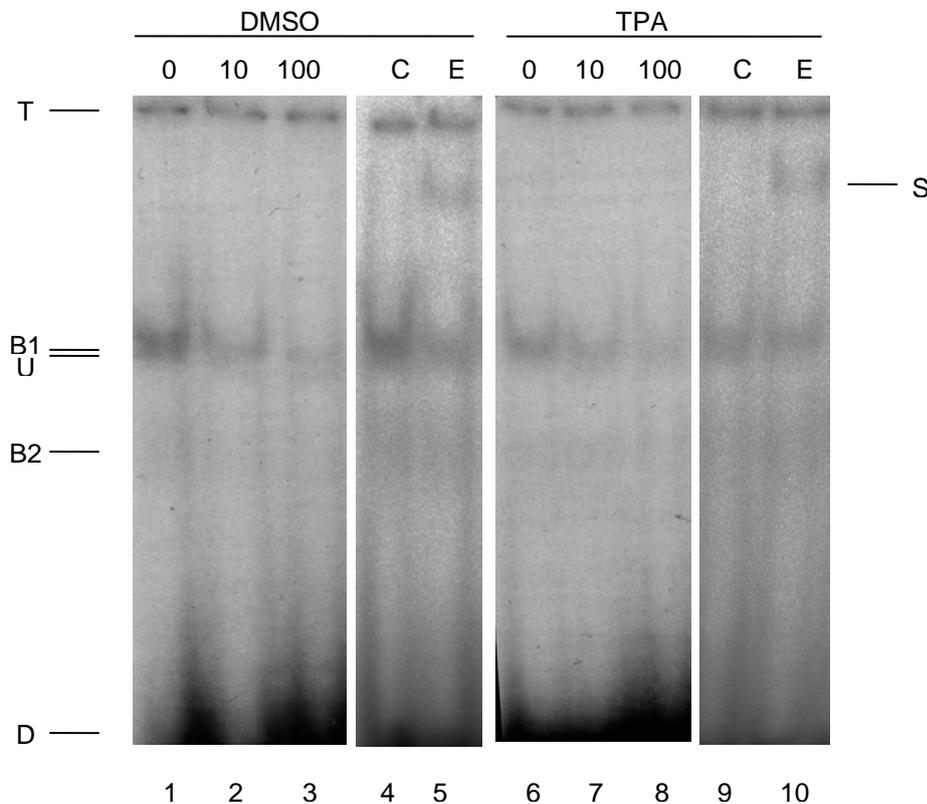


Abbildung 18: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in der Bande B1-B2. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Konkurrenz erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN-787 mit einer 10 und 100fachen Konzentration (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das anti-Ets-1-Antiserum.

In diesem Versuch war die Bande B1 deutlich und die Bande B2 schwach zu sehen, jedoch waren beide eindeutig kompetierbar, da sie durch die Verdünnungen in den Spuren 2 bis 3 und 7 bis 8 in ihrer Intensität deutlich abnahmen und daher spezifische Protein-DNA Bindungen darstellen. Knapp unterhalb der Bande B1 befand sich eine unspezifische, nicht kompetierbare Bande (U). In den Spuren 5 und 10 waren *Supershift*banden (S) erkennbar. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass ein ETS-Protein an das ODN -787 gebunden hat. Die Intensität der Shiftbande (B1) war unter DMSO-Bedingungen intensiver, als unter Stimulation mit TPA.

5.2.6 Das ETS-Motiv -816 im humanen ECE-1a Promotor

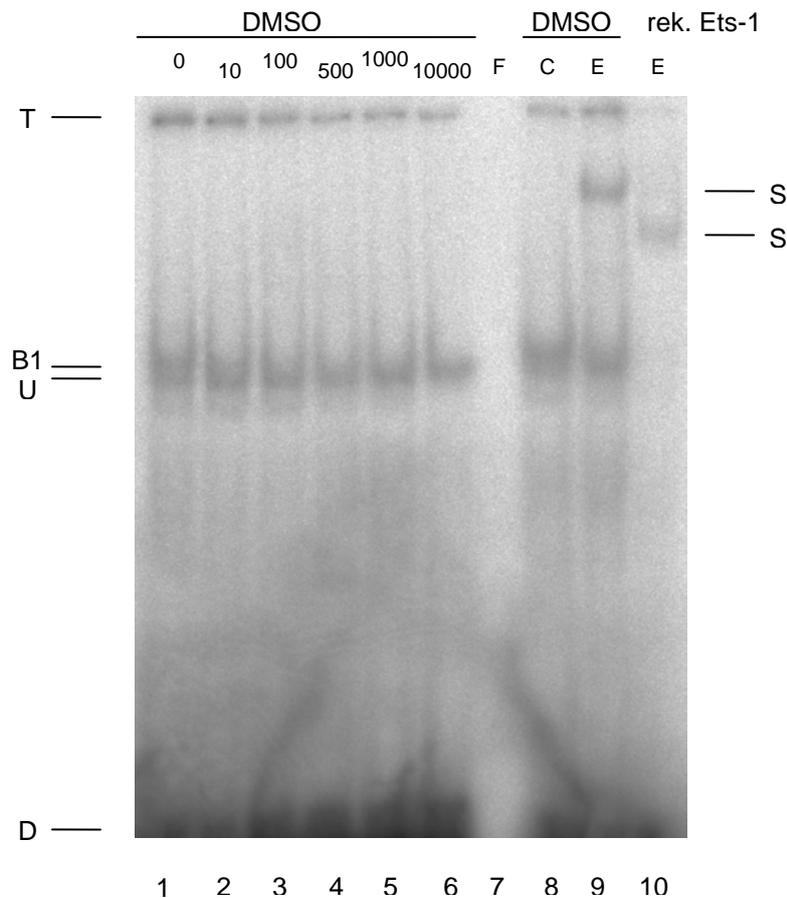


Abbildung 19: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten von mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen, sowie rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in der Bande B1, U bezeichnet eine unspezifische Bande. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Kompetition erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -816 mit den Konzentrationen 10, 100, 500, 1000 und 10000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Im Gel für das ODN -816 war die Bande B1 von der Bande U technisch sehr schwierig zu trennen. Deshalb erfolgten sehr umfangreiche Kompetitionsversuche (10-, 100-, 500-, 1000-, und 10000-fach). Dabei ließ sich in der Spur 1 eine Doppelbande erkennen, die aus der Bande B1 und der direkt darunter liegenden Bande U bestand. Während sich die Bande U trotz Kompetition in gleicher Intensität bis zur Spur 6 und darüber hinaus in Spur 8 und 9 fortsetzte, verschwand die Bande B1 bereits vollständig nach einer Kompetition mit 100fach nicht radioaktiv markiertem ODN -816. Auf der Ebene der Beladungstaschen (T) konnte man erkennen, dass das Gel zur Mitte hin leicht nach oben verzogen war, sodass die sichtbare Bande in den Spuren 5 und 6 weiterhin von ihrer Laufhöhe im Gel die Bande U repräsentierte. In Bande 9 zeigte sich eine klare *Supershift*bande. Auch in der Spur 8 schien es sich bei der scheinbar einzelnen Bande um eine Doppelbande zu handeln, da der „obere

Anteil“ in Spur 9 vollständig verschwunden war. Unter Einsatz von rekombinantem Ets-1 ergab sich ebenfalls eine *Supershift*bande (S) für den Protein-DNA-Komplex aus ETS-Protein, ODN -816 und Antikörper. Im Zusammenhang konnte hier der Nachweis erbracht werden, dass ein ETS-Protein unter basalen Bedingungen an das ODN -816 bindet.

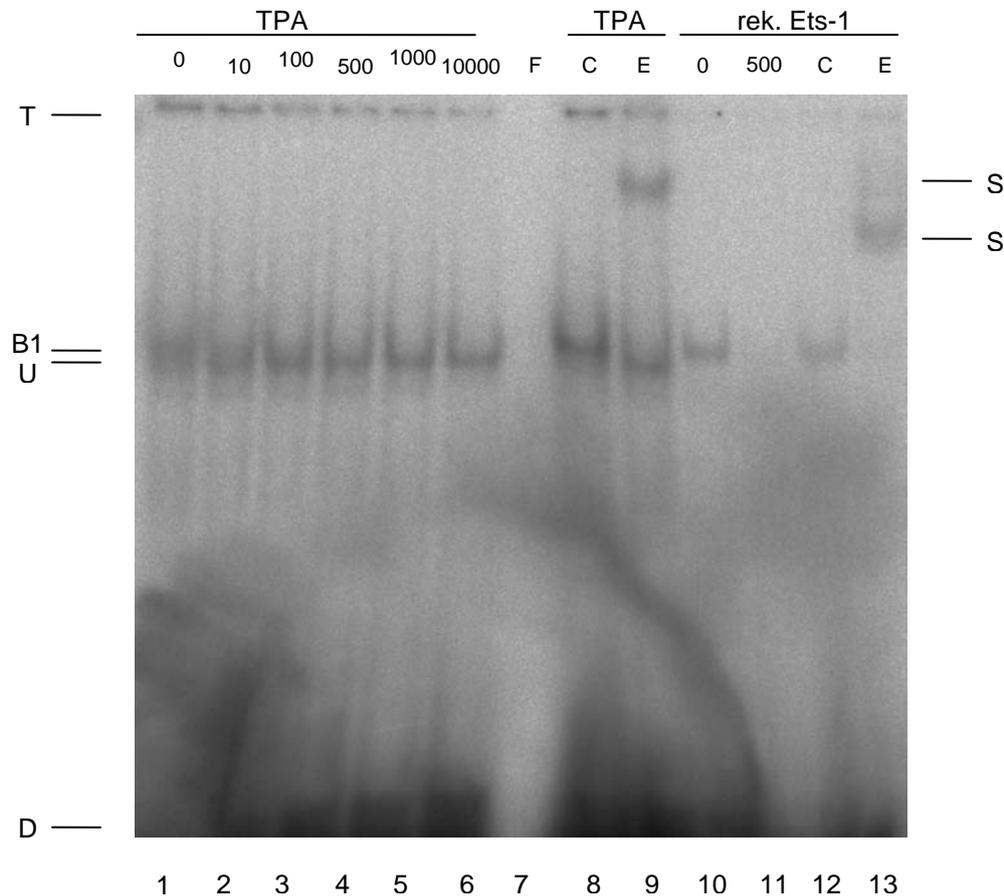


Abbildung 20: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in der Bande B1, U bezeichnet eine unspezifische Bande. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Kompetition erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -816 mit den Konzentrationen 10, 100, 500, 1000 und 10000fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Hier wurden nukleäre Kernextrakte von TPA-stimulierten EA.hy926 und rekombinantes Ets-1 Protein verglichen (Abb. 20). Zu der Ergebnisbeschreibung der Spuren 1 bis 9 siehe Beschreibung von Abb. 19. Zusätzlich wurde in diesem Versuch in den Spuren 10 und 11 rekombinantes Ets-1 Protein eingesetzt. Durch die 500fache Kompetition mit nicht radioaktiv markiertem ODN -816 konnte die Bande B1, die in Spur 10 klar abgrenzbar war, vollständig supprimiert werden. Im Höhenvergleich der Banden aus den Spuren 9 und 10 konnte man eindeutig den Unterschied zwischen der unspezifischen Bindung durch die Bande U und der

spezifischen Bande B1 sehen. Auch unter Stimulationsbedingungen hat somit ein ETS-Protein nachweislich an das ODN -816 gebunden.

5.2.7 Das ETS-Motiv -972 im humanen ECE-1a Promotor

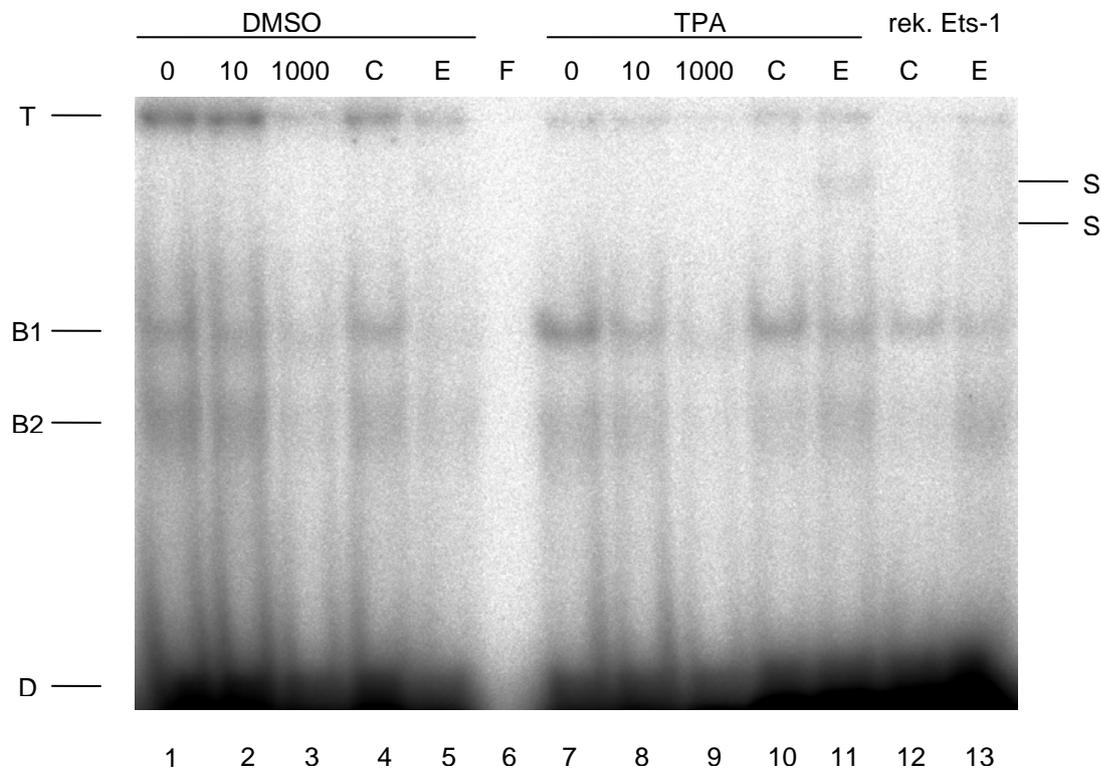


Abbildung 21: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus TPA-stimulierten EA.hy926 und mit DMSO versetzten EA.hy926-Kontrollen sowie rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in den Banden B1-B2. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Kompetition erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -972 mit einer 1000fachen Konzentration (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

In dem in Abb. 21 dargestellten Versuch waren zwei Banden (B1 und B2) deutlich erkennbar, die durch Verdünnung in den Spuren 2 bis 3 und 8 bis 9 in ihrer Intensität nachließen und daher spezifische Protein-DNA-Bindungen darstellen. Auffällig war, dass sich die Banden der TPA-stimulierten Zellen (Spur 7 bis 11) deutlich intensiver darstellten als bei unstimulierten Zellen (Spur 1 bis 6).

In den Spuren 5 und 11 waren schwache *Supershift*banden (S) erkennbar. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass ein ETS-Protein and das ODN -972 gebunden hat. Die Möglichkeit der Bindung des Transkriptionsfaktors Ets-1 konnte durch die *Supershift*bande in Spur 13 bewiesen werden, wobei diese im Verhältnis zum Kernproteingemisch sehr schwach ausgeprägt war, was daraufhin deuten kann, dass die Bindungsaffinität von Ets-1 zum ODN -972 eher schwach ist und an dieser Stelle ein anderes ETS-Protein die entscheidende Rolle spielt.

5.2.8 Das ETS-Motiv -602 im bovinen ECE-1a Promotor

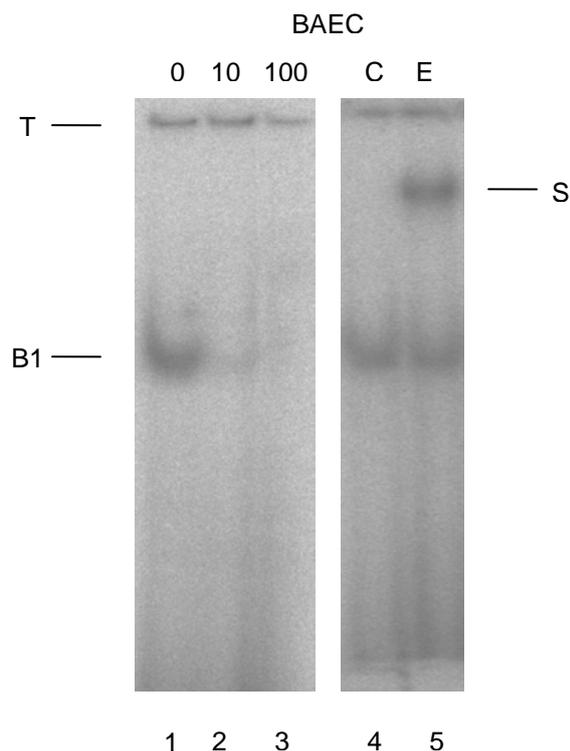


Abbildung 22: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus BAEC. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in der Bande B1. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande. Die Konkurrenz erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -602 mit den Konzentrationen 10fach und 100fach (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum.

In Abb. 22 sieht man die erfolgreiche Konkurrenz der Bande B1 in den Spuren 2 und 3 mit 10fachem und 100fachem Überschuss an nicht radioaktiv markiertem ODN -602. In Spur 3 war die Bande B1 komplett verschwunden und somit nachweislich spezifisch. Die Negativkontrolle mit dem Kontroll-Antiserum in der Spur 4 ergab keine *Supershift*-Bande. In der Spur 5 wurde das ETS-Antiserum hinzugegeben. Man konnte eine deutliche *Supershift*-Bande (S) sehen. Es konnte daher ein ETS-Protein eindeutig als Bindungspartner für das ODN -602 identifiziert werden. Versuche mit rekombinantem Ets-1 wurden nicht durchgeführt.

5.2.9 Das ETS-Motiv -622 im bovinen ECE-1a Promotor

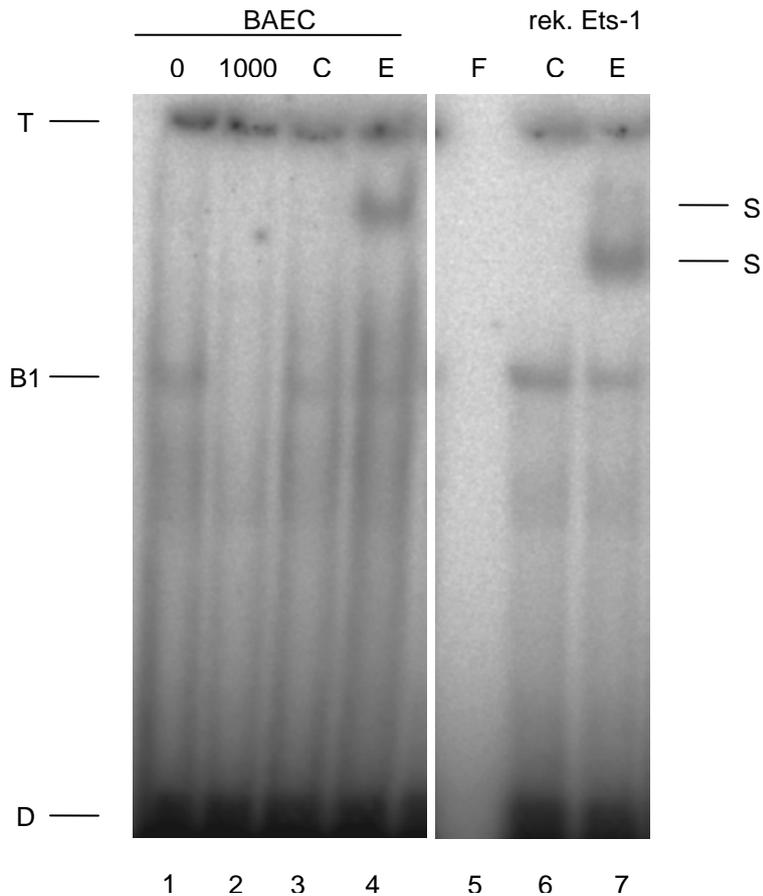


Abbildung 23: Electrophoretic Mobility Shift Assay mit nukleären Proteinextrakten aus BAEC und rekombinantem Ets-1 Protein. T gibt die Beladungstasche an. Spezifische Protein-DNA-Interaktionen zeigen sich in der Bande B1. S bezeichnet eine *Supershift*-Bande, D bedeutet freie DNA. Die Kompetition erfolgt durch nicht radioaktiv markierte ODN -622 mit einer 1000fachen Konzentration (siehe oberer Bildrand). C bezeichnet das Kontroll-Antiserum, E das ETS-Antiserum, die Spur F ist nur mit Farbstoff beladen.

Die Bande B1 ließ sich in der Spur 2 komplett kompetieren. In nukleären Extrakten von BAEC sowie durch rekombinant hergestelltes Ets-1 Protein ließen sich unter Verwendung von ETS-Antiserum *Supershift*banden (S) erzeugen. Damit konnte die Bindung eines ETS-Proteins an das ODN -622 und die Fähigkeit von Ets-1 an diese Sequenz zu binden bewiesen werden (*Supershift*bande in Spur 7).

5.3 Funktionelle Promotoranalyse

Bei der Ergebnisdarstellung wird generell auf der y-Achse entweder die relative *Luciferaseaktivität* (RLA) oder die normalisierte RLA (nRLA) angegeben. Die RLA ist wie folgt definiert :

$$RLA = \frac{\text{Firefly Luciferase}_{\text{Konstrukt}} / \text{Renilla Luciferase}_{\text{Konstrukt}}}{\text{Firefly Luciferase}_{\text{pGl3Basic}} / \text{Renilla Luciferase}_{\text{pGl3Basic}}}$$

Die normalisierte RLA (nRLA) wird angegeben als :

$$nRLA = \frac{RLA_{\text{Mutante}}}{RLA_{\text{Wildtyp}}}$$

Diese gibt den Faktor der Aktivität gegenüber dem Wildtypen an.

5.3.1 Untersuchungen an bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC)

Um die Regulierung des bovinen ECE-1a Promotors durch den Transkriptionsfaktor Ets-1 beurteilen zu können, wurden verschiedene Bindungsstellen für Ets-1 mutiert, sodass das Protein nicht mehr in der Lage ist, an die DNA zu binden. Diese sind in Abb. 24 dargestellt. Die Konstrukte wurden in BAEC transfiziert und die Änderung der Aktivität der Reportergenvektoren luminometrisch gemessen (siehe Methodenteil „Transfektion“). Den stärksten Abfall der Aktivität (Abb. 24B) sah man bei dem verwendeten Konstrukt -MM. Die Bezeichnung bedeutet „multipel mutiert“, da alle in der Abb. 24A dargestellten Konsensussequenzen für Ets-1 mutiert wurden, um die Bindung des Proteins an die DNA zu verhindern. Man sah eine Abnahme der Aktivität von 93%, was dafür spricht, dass die hauptsächliche Aktivierung des Promotors durch die Bindung von Ets-1 an die entsprechenden Konsensussequenzen vermittelt wurde. Während das Konstrukt -622M nur zu einer Aktivitätsabnahme auf 83% führte, führte die Mutation an der Konsensussequenz -602 zu einer Aktivitätsabnahme von 54%. Die Mutation beider Bindungsstellen lag im Aktivitätsbereich zwischen den beiden Einzelmutationen bei 56% des Vollkonstruktes. Die beiden Konsensussequenzen für Ets-1 an den Stellen -241 und -211 zeigten bei Mutation eine starke Abnahme der Promotoraktivität von 59% bzw. 68%. Die Mutation beider Bindungsstellen (-241M/-211M) dagegen ergab nur eine Abnahme der Promotoraktivität um 50%. Hier scheinen keine additiven Effekte zu wirken, sondern komplexe Wechselwirkungen zu bestehen. Dies sah man auch an

den Konstrukten -366M und -180M, die bei Mutation leicht aktivierende Wirkungen zeigten (Faktor 1,2). Die Aktivität der Dreifachmutante -241M/-211M/-180M unterschied sich nur geringfügig bzw. nicht signifikant von den Einzelmutationen -241 und -211. Außer dem Konstrukt -366 unterschieden sich alle anderen Konstrukte signifikant vom Wildtypkonstrukt 1209wt in Bezug auf ihre Aktivität.

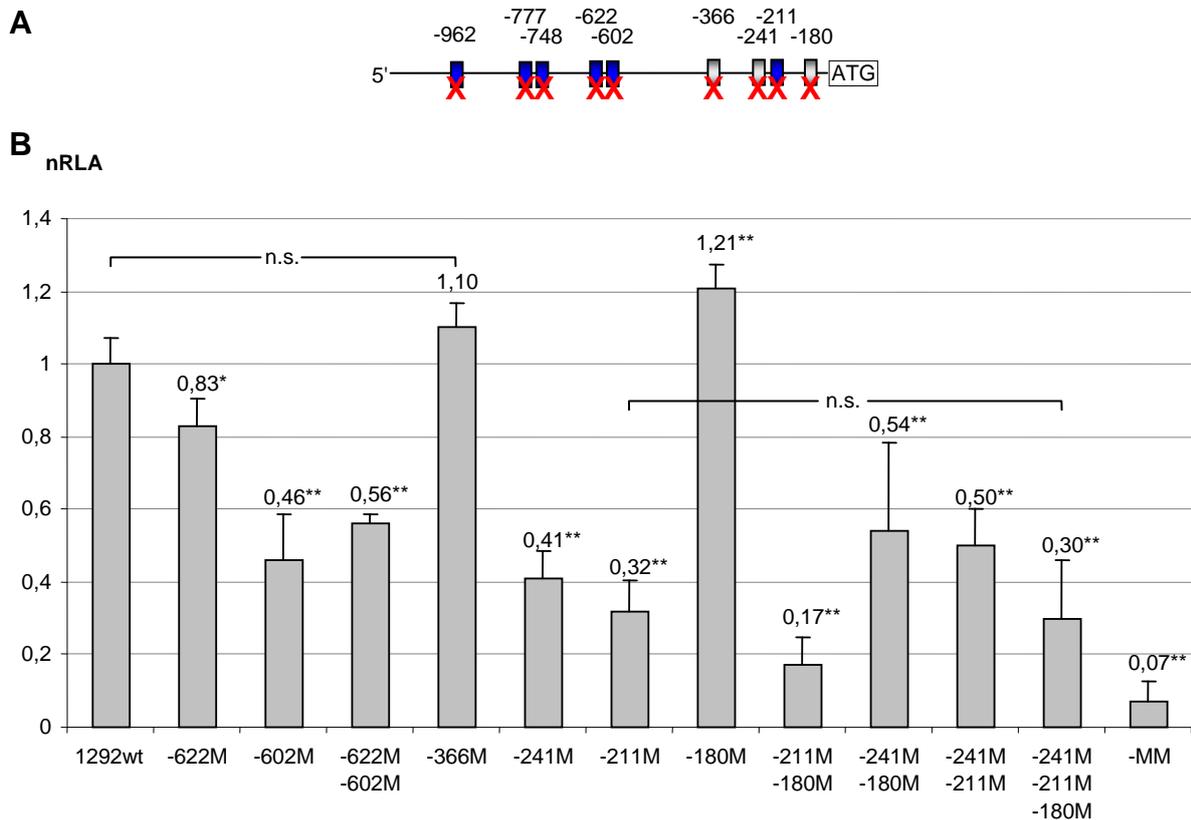


Abb. 24: **A:** Schematische Darstellung des bovinen ECE-1a Promotors. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere Bindungsstellen für Ets-1. Die roten Kreuze markieren mutierte Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **B:** Darstellung der Aktivität des bovinen ECE-1a Promotors in BAEC. Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht M für Mutation, MM für multiple Mutante. Der Wert über den Balken gibt die relative Aktivität zum Wildtypen (1292wt) an, der auf den Wert 1,0 gesetzt wurde. Nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit n.s. gekennzeichnet. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen, * gibt eine Signifikanz von $p < 0,05$ gegenüber dem Wildtypen an.

5.3.2 Untersuchungen an humanen EA.hy926-Endothelzellen

Stimulation mit TPA

In der Zelllinie EA.hy926 konnte durch Stimulationsversuche mit dem Phorbolster TPA ein zeitlicher Zusammenhang zwischen einem Anstieg der Expression für Ets-1 und einem Anstieg der Expression für ECE-1a mRNA gezeigt werden, während die anderen Isoformen davon weitgehend unberührt blieben (Orzechowski et al., 2001). RPA-Analysen zeigten basal einen sehr niedrigen Wert für die Isoform ECE-1a, während die anderen Isoformen stärker exprimiert wurden. Die Isoformen ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d waren unter Stimulation in ihrer Expression insgesamt kaum beeinflusst (Orzechowski et al., 2001).

Da der Phorbolster TPA in vitro wie der physiologische Aktivator DAG wirkt (Dekker et al., 1994), konnte in den folgend dargestellten Versuchen der Einfluss des über die Proteinkinase C (PKC) vermittelten Weges auf den ECE-1a Promotor genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit TPA kostimuliert und mit den DMSO-versetzten Kontrollgruppen verglichen (Abb. 25).

Mit zunehmender Kürze der Konstrukte zeigte sich eine signifikante Abnahme der Aktivität des Promotors, sowohl unter Basalaktivität bei DMSO-Kontrollen als auch unter Stimulation mit TPA. Bei isolierter Betrachtung der Zellen unter Basalbedingungen (hellgraue Balken) konnte man eine Abnahme der Aktivität des Promotors bei der Deletionsmutante -736 um 50%, beim Konstrukt -498 um 86% und beim Konstrukt -267 um 93% sehen. Im direkten Vergleich der TPA-stimulierten Zellen untereinander (dunkelgraue Balken) wiesen das Konstrukt -736 eine Abnahme der Aktivität um 53%, das Konstrukt -498 um 84% und das Konstrukt -267 um 96% gegenüber dem Wildtypen (1209wt) auf, d.h. TPA-stimulierte Zellen und DMSO Kontrollen verhielten sich untereinander ähnlich. Bei allen TPA-stimulierten Konstrukten konnte man eine signifikante Steigerung der Aktivität gegenüber DMSO-Kontrollen im Mittel um den Faktor 1,9 (1,8-2,1) sehen. Das Konstrukt -267 zeigte keine Veränderung der Aktivität (Faktor 1,0). Dies lässt vermuten, dass die wichtigen regulatorischen Zentren, die über TPA eine Aktivierung des Promotors vermitteln, weiter in Richtung 5' des kurzen Bereiches des Konstruktes -267 liegen.

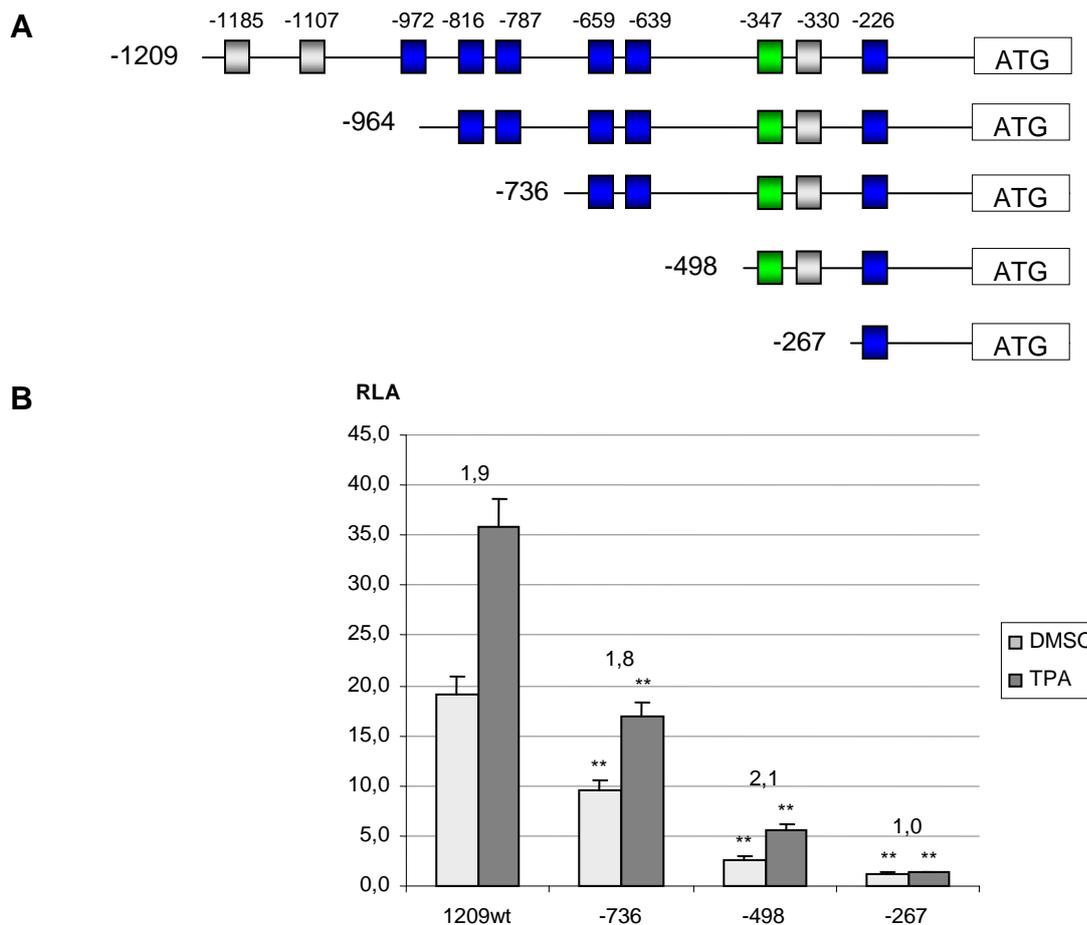


Abb. 25: A: Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere ETS-Konsensussequenzen. Die grüne Box kennzeichnet die vor dieser Arbeit putative ETS-Konsensussequenz an Position -347, die nicht bestätigt werden konnte. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **B:** Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in EA.hy926 unter TPA-Stimulierung im Vergleich mit DMSO-Kontrollen. Auf der y-Achse ist die relative Luciferaseaktivität angegeben (RLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp. Der Wert über den Balken gibt den jeweils relativen Aktivitätsunterschied zwischen dunklem und hellem Balken an. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen der jeweils gleichen Farbe.

Kostimulation mit TPA und Ets-1

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors Ets-1 in dem durch die PKC vermittelten Weg der Regulation des ECE-1a Promotors abzuschätzen, wurden die Zellen mit Ets-1 und in Gegenüberstellung mit TPA stimuliert. Ebenso wurde der Effekt der Doppelstimulation untersucht. Zur Stimulation mit Ets-1 wurde das Ets-1 Expressionskonstrukt benutzt. Dieses besteht aus einem cDNA-Fragment mit dem vollständigen Leserahmen für das humane Ets-1 Protein, welches als PCR-Produkt in den Vektor *pCR3.1* kloniert wurde. Der Vektor *pCR3.1* ohne Insert wurde als Leervektor verwendet. Um gleiche Bedingungen zu erhalten, wurden auch die DMSO-Kontrollen bzw. die TPA-stimulierten Zellen ohne Ets-1-Kostimulation mit dem Leervektor *pCR3.1* kotransfiziert. Die hellgrauen Balken in Abb. 26 beschreiben die

Basalaktivität der Kontrollzellen. Alle vier Konstrukte verhielten sich unter alleiniger TPA-Stimulation ähnlich, wenn man jedes Konstrukt für sich betrachtet. Im Mittel konnte eine 2,1fache Aktivierung gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrolle verzeichnet werden.

Unter alleiniger Stimulation mit dem Ets-1 Expressionskonstrukt (DMSO/Ets-1, lila Balken) gab es deutliche Unterschiede in der Steigerung der Aktivität gegenüber dem jeweiligen Kontrollkonstrukt (DMSO/pCR3.1, hellgraue Balken). Das volle Konstrukt 1209wt erreichte eine Aktivitätszunahme um den Faktor 20,8. Die Deletionsmutante -964 wurden um den Faktor 17,6, die Deletionsmutante -736 um den Faktor 15 und die Deletionsmutante -498 nur noch um den Faktor 6,8 stärker aktiviert. Das volle Konstrukt wurde mithin ca. dreimal so stark aktiviert wie die Deletionsmutante -498. Insgesamt wurden aber alle Konstrukte durch Stimulation mit dem Ets-1 Expressionskonstrukt (lila Balken) deutlich stärker als durch Stimulation mit TPA aktiviert (dunkelgraue Balken).

Die stärkste Aktivierung erfolgte bei Doppelstimulation (schwarze Balken). Bei isolierter Betrachtung jedes einzelnen Konstrukts (jeweils schwarzer gegenüber hellgrauem Balken), wurde das Konstrukt 1209wt um den Faktor 30,7, die Deletionsmutante -964 um den Faktor 24,6, die Deletionsmutante -736 um den Faktor 18,9 und die Deletionsmutante -498 um den Faktor 13,4 aktiviert.

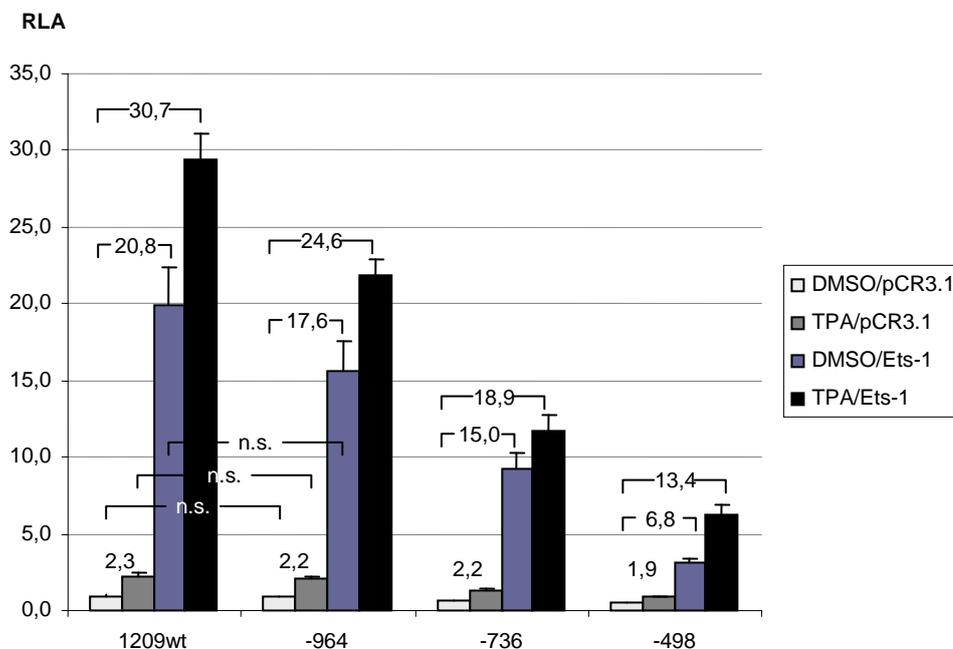


Abb. 26: Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in EA.hy926 unter TPA- bzw. Ets-1 Kostimulation. Auf der y-Achse ist die relative Luciferaseaktivität angegeben (RLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp. Nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit n.s. gekennzeichnet. Alle anderen Werte sind zum Wildtypen der jeweils gleichen Farbe mit einem Wert von $p < 0,01$ signifikant unterschiedlich.

Stimulation mit TPA und Einfluss auf das Tandemmotiv -639/-659

Der Transkriptionsfaktor Ets-1 wurde bisher in der gängigen Literatur als ein auf Promotoren aktivierend wirkendes Protein bei DNA-Bindung beschrieben (Sharrocks et al., 1997). Daher sollte man bei Mutation der Bindungsstelle eine Abnahme der Aktivität gegenüber dem Wildtypkonstrukt erwarten. In BAEC konnte dies für die konservierten Bindungsstellen -622 und -602 auch gezeigt werden (Abb. 24). In EA.hy926-Zellen führte die Mutation der ETS-Konsensussequenz -659 zu einer Abnahme der Aktivität des Promotors auf 44% (Abb. 27A₂). Die Mutation der ETS-Konsensussequenz -639 jedoch führte zu einer signifikanten Aktivierung des Promotors um den Faktor 3,16. Ebenso die Doppelmutation -639M/-659M (Faktor 2,59). Betrachtet man dagegen die kürzere Deletionsmutante -736, so führte die jeweilige Mutation interessanterweise zu einem Abfall der Aktivität des Promotors. Dies könnte bedeuten, dass Ets-1 nicht nur aktivierend auf den ECE-1a Promotor wirkt. Möglich ist auch, dass andere ETS-Proteine bei der Repression eine entscheidende Rolle spielen.

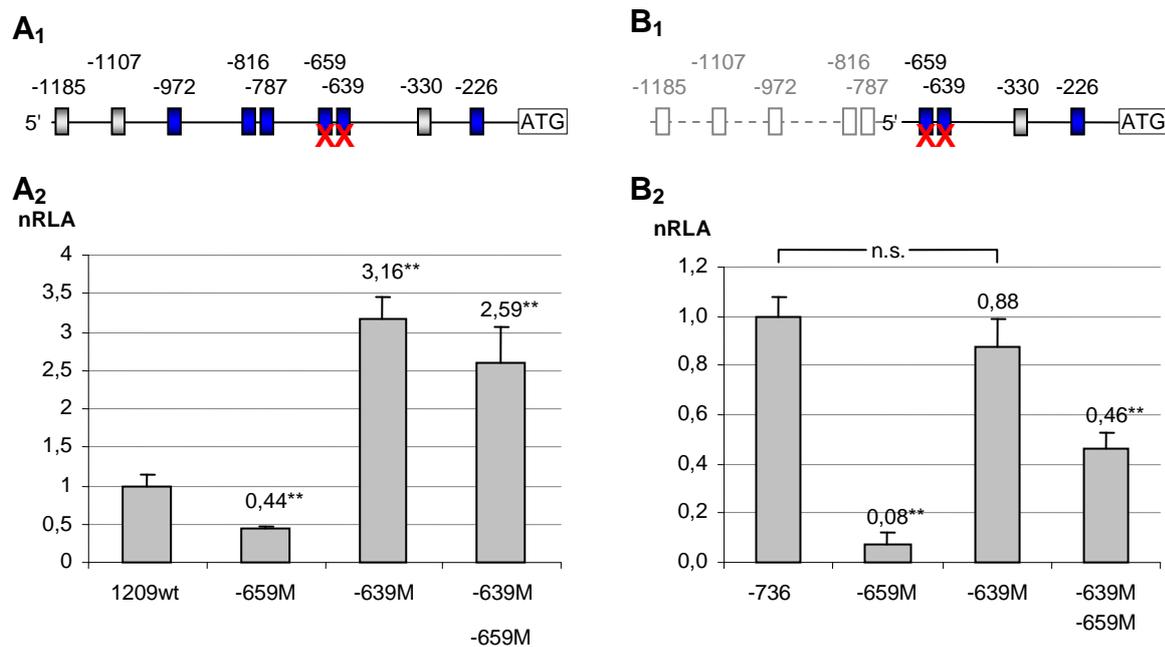


Abb. 27: **A₁/B₁:** Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere Bindungsstellen für Ets-1. Die roten Kreuze markieren die hier verwendeten mutierten Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **A₂/B₂:** Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in EA.hy926 unter Verwendung von mutierten Bindungsstellen auf dem Konstrukt 1209wt (**A₂**) und -736 (**B₂**). Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp und M für Mutante. Der Wert über den Balken gibt die relative Aktivität zum ersten Konstrukt in der Abb. an (1209wt bzw. -736), die jeweils auf den Wert 1,0 gesetzt wurden. Nicht signifikant unterschiedlich ist mit n.s. gekennzeichnet. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen (**A₂**), bzw. gegenüber dem Konstrukt -736 (**B₂**).

Stimulation des Konstruktes 1209wt mit Ets-1

Ebenso wie im vorherigen Versuch wurden hier Konstrukte mit einzeln und doppelt mutierten Bindungsstellen (-639 und -659) verwendet (Abb. 28). Bereits unter basalen Bedingungen zeigte sich eine Aktivierung der Mutante -639 im Vergleich zum Wildtypen 1209wt. Dies bestätigt das Ergebnis in Abb. 27A. Ebenso verhielt sich das Konstrukt -639M/-659M, welches eine Doppelmutation des Tandemmotivs darstellt. Die Mutation der ETS-Konsensussequenz -659 führte dagegen zu einem signifikanten Abfall der Aktivität des ECE-1a Promotors im Vergleich zum Wildtypen. Unter Stimulationsbedingungen konnte man bei Verwendung der Konstrukte -639M und -639M/-659M keine signifikante Änderung der Aktivierung beobachten. Das Konstrukt -659M führte ebenso wie die Kontrollgruppe zu einem signifikanten Abfall der Aktivität ($p < 0,01$).

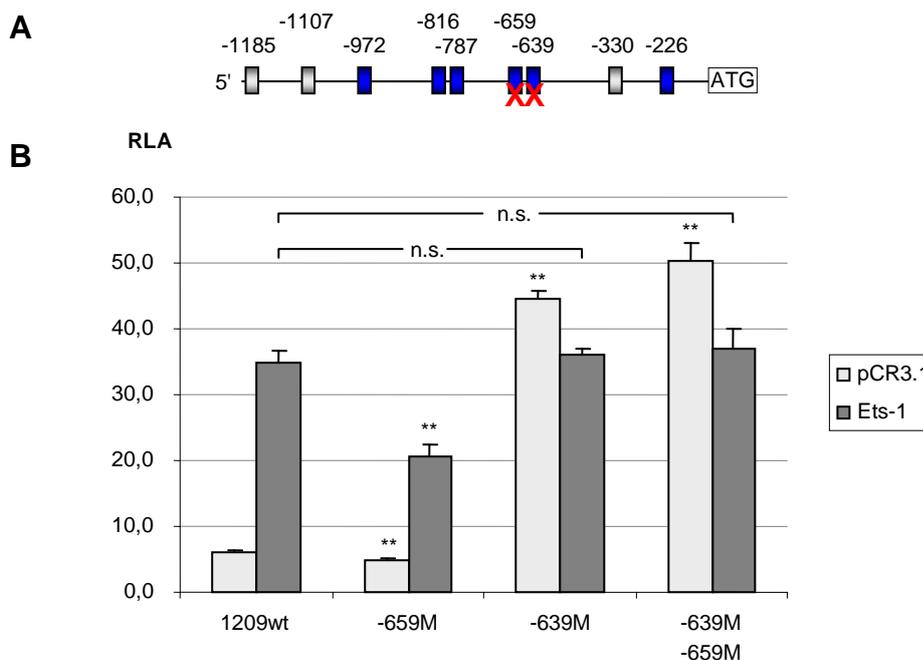


Abb. 28: **A:** Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere Bindungsstellen für Ets-1. Die roten Kreuze markieren die hier verwendeten mutierten Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **B:** Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in EA.hy926 unter Ets-1 Stimulierung im Vergleich mit dem Leervektor *pCR3.1*. Auf der y-Achse ist die relative Luciferaseaktivität angegeben (RLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp und M für Mutante. Nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit n.s. gekennzeichnet. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen der jeweils gleichen Farbe.

Stimulation des Konstruktes -736 mit Ets-1

Das verkürzte Konstrukt -736 verhielt sich bei Mutation der in Abb. 29 dargestellten Bindungsstellen unter Stimulation mit Ets-1 ähnlich wie bei Stimulation mit TPA (Abb. 27B₂). Auch hier zeigte sich bei Mutation der einzelnen Bindungssequenzen jeweils ein Abfall der Aktivität des Promotors im Vergleich zum unveränderten Konstrukt -736. Dies galt sowohl für stimulierte Zellen (dunkelgraue Balken), als auch für die Kontrollgruppe (hellgraue Balken). Lediglich die Doppelmutante -639M/-659M zeigte unter basalen Bedingungen keinen signifikanten Unterschied zum Konstrukt -736. Weiterhin konnte eine besonders starke Abnahme der Aktivität der Mutation der Bindungsstelle -659 verzeichnet werden.

Bemerkenswert war der Unterschied zur Mutationsanalyse am Konstrukt mit voller Länge (1209wt, Abb. 28). Im Konstrukt 1209wt wurde bei Mutation der Bindungsstelle -639 die Induzierbarkeit des Promotors nicht aufgehoben (Aktivitätsanstieg), während dies beim verkürzten Konstrukt (-736) bei Mutation dieser Bindungsstelle der Fall war (Aktivitätsabfall). Hingegen ließ sich die Induzierbarkeit des Promotors bei Mutation der Bindungsstelle -659 sowohl im langen Konstrukt (1209wt) als auch im verkürzten Konstrukt (-736) aufheben.

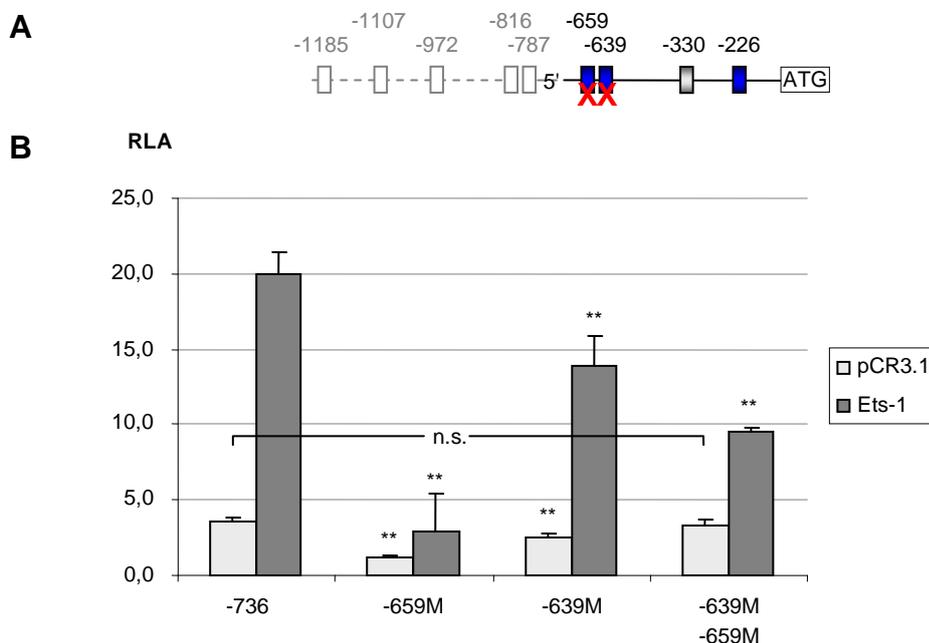


Abb. 29: A: Schematische Darstellung der Konstrukte des humanen ECE-1a Promotors. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere Bindungsstellen für Ets-1. Rote Kreuze markieren mutierte Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **B:** Vergleich der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in EA.hy926 unter Ets-1 Stimulierung und mit Leervektor pCR3.1. Auf der y-Achse ist die relative Luciferaseaktivität angegeben (RLA). Auf der x-Achse sind die Konstrukte aufgetragen, dabei steht M für Mutante. Nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit n.s. gekennzeichnet. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Konstrukt -736 der jeweils gleichen Farbe.

5.3.3 Untersuchungen an humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC)

Stimulation mit TPA

HMEC-Zellen wiesen ebenso wie EA.hy926 eine niedrige basale ECE-1a mRNA Expression auf, während die anderen Isoformen von ECE-1 stärker konstitutiv exprimiert wurden (unveröffentlichte Daten). Aufgrund besserer Eigenschaften bei den Transfektionsstudien wurden im Weiteren Konstrukte vor allem an dieser Zelllinie getestet.

In Abb. 30 dargestellt sind HMEC-Zellen unter TPA-Stimulation. Es wurde eine Aktivierung des Promotors durch Stimulation mit TPA um den Faktor 5,95 erreicht. Dieser Effekt war deutlich stärker als in EA.hy926-Zellen.

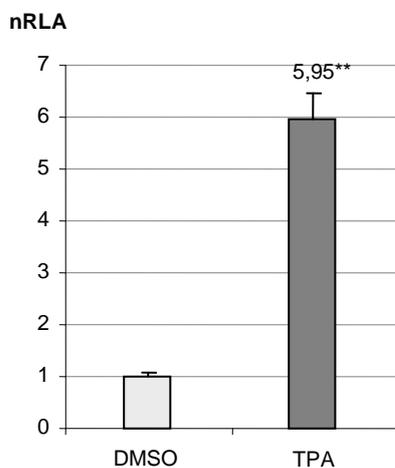


Abb. 30: Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in HMEC-1 unter TPA Stimulierung im Vergleich mit DMSO-Kontrollen. Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind TPA stimulierte HMEC-1 gegenüber DMSO-Kontrollen aufgetragen. Der Wert über dem dunklen Balken gibt den relativen Aktivitätsunterschied zu den DMSO-Kontrollen an, deren Aktivität auf den Wert 1,0 gesetzt wurde. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber der DMSO-Kontrolle.

Mutationen im Konstrukt 1209wt

In Abb. 31A sind die in diesem Versuch verwendeten Konstrukte schematisch dargestellt. Dabei wurden jeweils einzelne Bindungsstellen mutiert und die Tandemmotive -787/-814, sowie -639/-659 zusätzlich doppelt ausgeschaltet. Ebenso wie in EA.hy926-Zellen konnte durch die Mutation der ETS-Konsensussequenz -639 eine Aktivierung des Promotors verzeichnet werden (Abb. 31B). Die hier auftretenden Effekte waren jedoch sehr viel stärker als in EA.hy926 (Faktor 56,8). Die Mutationen der Bindungsstellen -787, -814, -787/-814, -226 sowie -639/-659 zeigten ebenfalls eine starke Aktivierung des Promotors. Lediglich aus der Mutation der Bindungsstelle -659 resultierte ein weiterer, signifikanter Abfall der basal ohnehin geringen Aktivität des Promotors auf 66%.

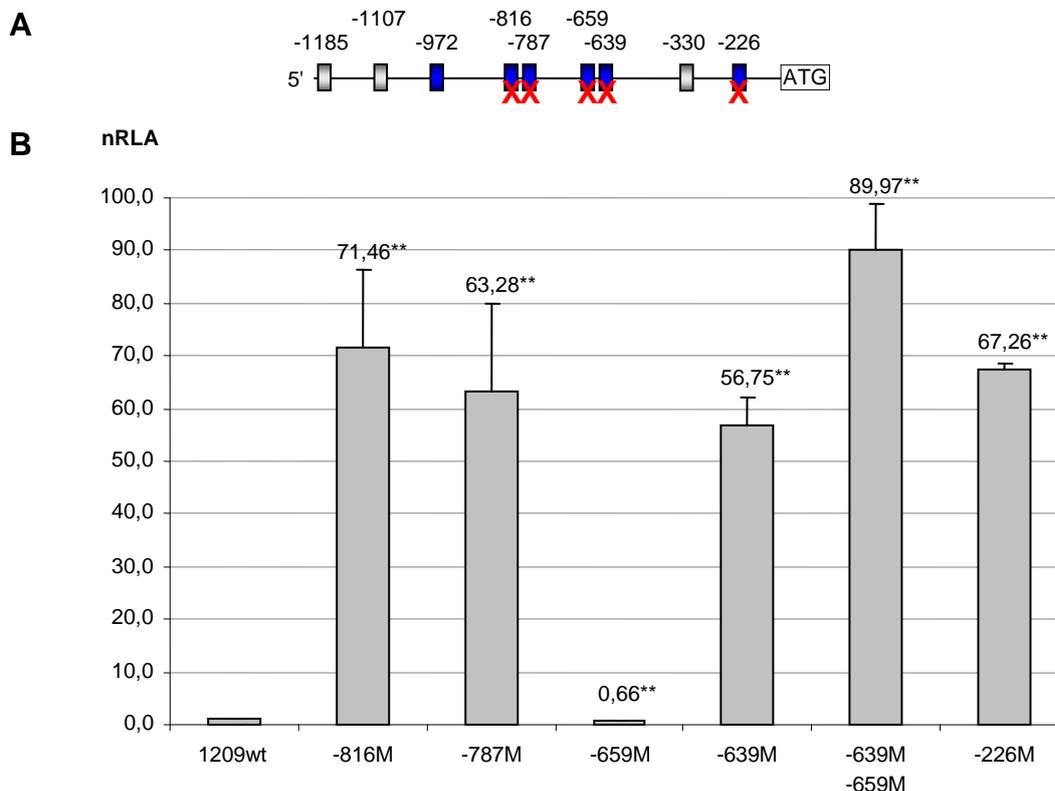


Abb. 31: **A:** Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere Bindungsstellen für Ets-1. Die roten Kreuze markieren die hier verwendeten mutierten Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **B:** Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in HMEC-1. Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp und M für Mutation. Der Wert über den Balken gibt die relative Aktivität zum Wildtypen (1209wt) an, der auf den Wert 1,0 gesetzt wurde. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen.

Mutationen im Konstrukt -736

Das Tandemmotiv -639/-659 verhielt sich bei Mutation der ETS-Konsensussequenzen im verkürzten Konstrukt -736 anders als im Vollkonstrukt 1209wt. Dieser Effekt konnte schon in der humanen Zelllinie EA.hy926 beobachtet werden. Hier zeigte sich bei den Einzelmutationen und auch bei der Doppelmutation des Tandemmotivs jeweils ein Absinken der Promotoraktivität (Abb. 32). Es scheint daher, dass die regulatorischen Eigenschaften dieser Region in Wechselwirkung mit weiter in Richtung 5' gelegenen Regionen des Promotors stehen.

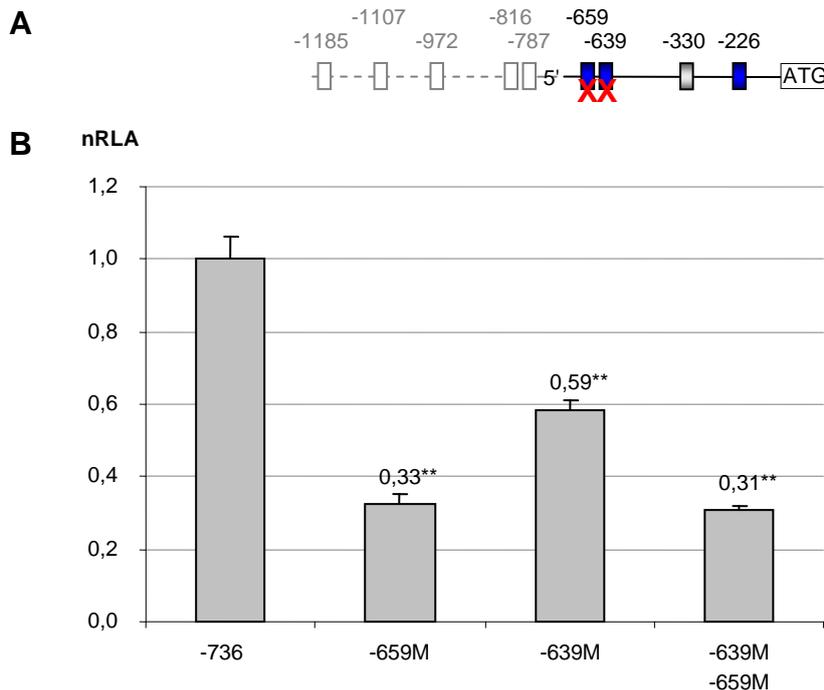


Abb. 32: **A:** Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar. Die roten Kreuze markieren die hier verwendeten mutierten Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **B:** Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in HMEC-1. Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht M für Mutation. Der Wert über den Balken gibt die relative Aktivität zum Konstrukt -736 an, welches auf den Wert 1,0 gesetzt wurde. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Konstrukt -736.

Die weiter in Richtung 5' gelegene Promotorregion

Aus den Transfektionsexperimenten mit dem vollen Konstrukt 1209wt und dem verkürzten Konstrukt -736 in EA.hy926 und HMEC-1 wird klar, dass die in Richtung 5' gelegene Region von Bedeutung für die Regulation des ECE-1a Promotors ist. Daher wurde das Tandemmotiv -787/-816 sowie der Einfluss auf die ETS-Konsensussequenz -226 an weiteren Konstrukten in HMEC-1-Zellen untersucht (Abb. 33).

Die Konstrukte 1209wt, -1180 und -1086 zeigten eine ähnliche Grundaktivität.

anderen längeren Deletionsmutanten. Die Mutation -787 führte nun nicht mehr zu einem signifikanten Anstieg der Promotoraktivität. Die Mutation -226 verursachte sogar einen Verlust der Promotoraktivität auf 72%. Dies deutet daraufhin, dass der Bereich zwischen der Position -1086 und -964 eine Interaktion mit anderen Bindungsstellen wie -787 und auch der sehr weit 3' gelegenen Region vermittelt.

5.3.4 Der ECE-1a Promotor in verschiedenen Zelllinien

Da sowohl in der Zelllinie EA.hy926, als auch in HMEC, die beide von humanen Endothelzellen ausgehen, ein ähnlicher Effekt bezüglich der Aktivität des Promotors bei Mutation der Bindungsstelle -639 auftrat, diese aber in bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC) einen anderen Effekt aufwies, kann man einen speziesabhängigen Regulationsmechanismus postulieren. Zur genaueren Untersuchung dieses Regulationsmechanismus wurde zunächst der humane Promotor in Zelllinien verschiedener Spezies und Zellart transfiziert und die Aktivität der Mutationskonstrukte -639M, -659M und -639M/-659M verglichen. In einem weiteren Versuch wurden der humane und der bovine Promotor jeweils in die gleiche Zellart transfiziert und die gemessene Aktivität direkt verglichen.

Der humane ECE-1a Promotor in verschiedenen Zelllinien

Bei einem Vergleich der Aktivität der Mutationskonstrukte des humanen ECE-1a Promotors in verschiedenen Zelllinien fiel auf, dass ein starker Unterschied zwischen boviner Spezies (Abb. 34C, nächste Seite) und den anderen Spezies besteht (Abb. 34B, D-G). Ausschließlich in BAEC (makrovaskuläres Endothel, Rind) führten alle Mutationen zu einem Verlust an Promotoraktivität.

In HMEC (mikrovaskuläres Endothel, Mensch), EA.hy926 (Fusion aus Umbilikalvenenendothel (HUVEC) und epitheliale Tumor, Mensch), ECV304 (epithelialer Tumor, Mensch), H9c2-Zellen (Kardiomyoblasten, Ratte) und CHO-Zellen (epithelial, Hamster) bewirkte die Doppelmutation -639M/-659M eine starke Aktivierung des Promotors, während dies in BAEC nicht der Fall war. Ebenso bei Mutation der Konsensussequenz -639.

Allen Zellen war die Abnahme der Aktivität bei Mutation der ETS-Konsensussequenz -659 gemeinsam, mit Ausnahme in ECV304-Zellen, die keine signifikante Änderung der Aktivität zum Wildtyp verzeichnete. Dies lässt vermuten, dass dem Tandemmotiv in der Regulierung des ECE-1a Promotors eine entscheidende Rolle zukommt, die auch abhängig von der Spezies zu sein scheint.

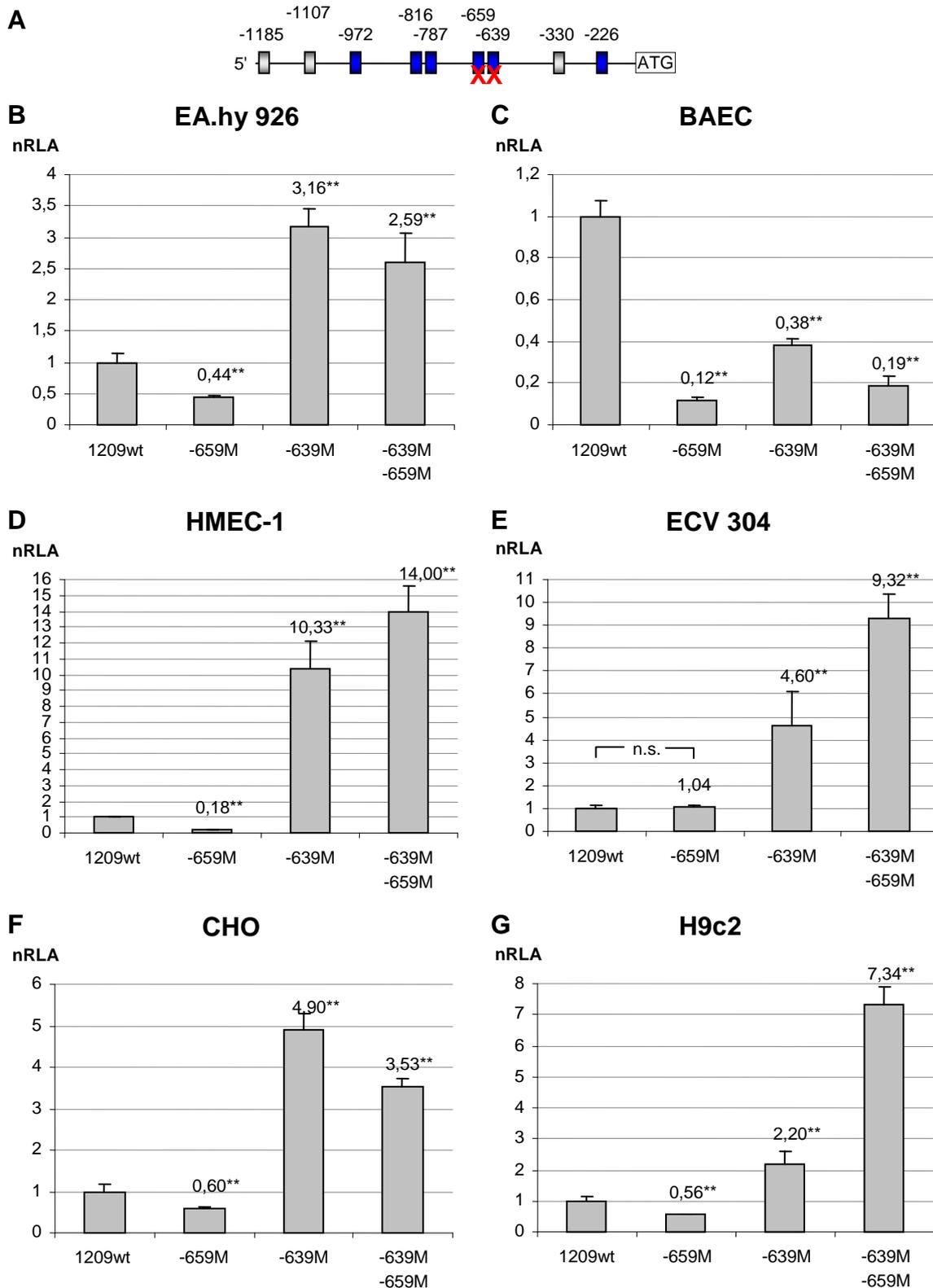


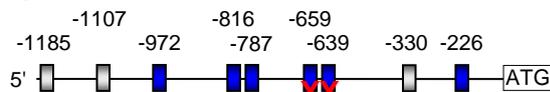
Abb. 34: **A:** Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar. Die roten Kreuze markieren mutierte Bindungsstellen. ATG steht für das Startcodon des ECE-1a Transkripts. **B-G:** Darstellung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors in verschiedenen Zelllinien (siehe jeweils Überschrift). Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp und M für Mutation. Der Wert über den Balken gibt die relative Aktivität zum Konstrukt -1209wt an, welches auf den Wert 1,0 gesetzt wurde. Nicht signifikant unterschiedliche Werte sind mit n.s. gekennzeichnet. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen (-1209wt).

5.3.5 Die ECE-1a Promotoren in einer Zellart

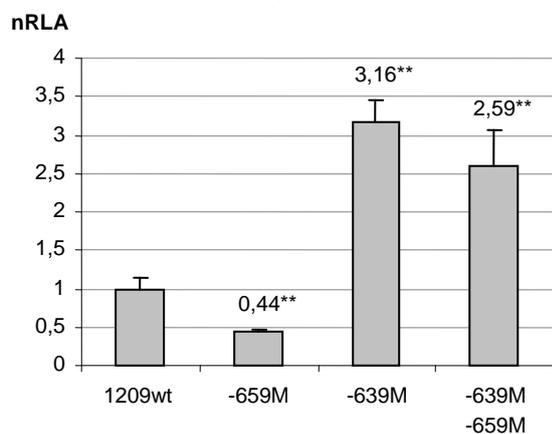
Die Abb. 35A₂ und 35B₂ zeigen die beiden Promotoren in EA.hy926-Zellen, die Abb. 35A₃ und 35B₃ in CHO-Zellen. Es wurden jeweils die evolutionär konservierten Bindungsstellen mutiert. Man sah bei direktem Vergleich sowohl in EA.hy926-Zellen als auch in CHO-Zellen einen deutlichen Unterschied in der Aktivität der Promotoren nach Mutation der ETS-Konsensussequenzen -639 und -639/-659. Der humane Promotor wurde in seiner Aktivität verstärkt, während der bovine Promotor in seiner Aktivität abgeschwächt war. Die humane ETS-Konsensussequenz -659, die der bovinen ETS-Konsensussequenz -622 entspricht, führte hingegen immer zu einem Verlust an Aktivität. Der humane und bovine ECE-1a Promotor wurden weiterhin zur Gegenüberstellung in die Zelllinien BAEC, HMEC-1 und ECV304 transfiziert, was zu funktionell ähnlichen Ergebnissen geführt hat (Daten nicht gezeigt).

Humaner ECE-1a Promotor

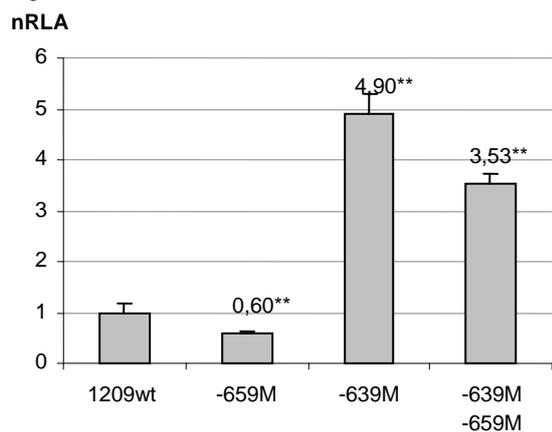
A₁



A₂

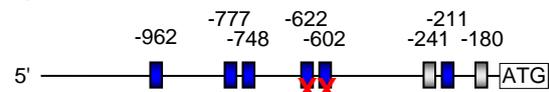


A₃

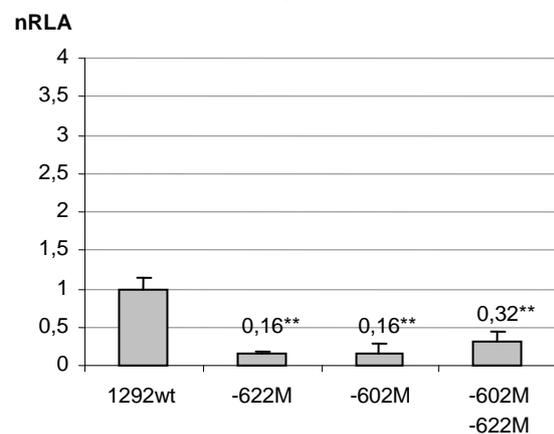


Boviner ECE-1a Promotor

B₁



B₂



B₃

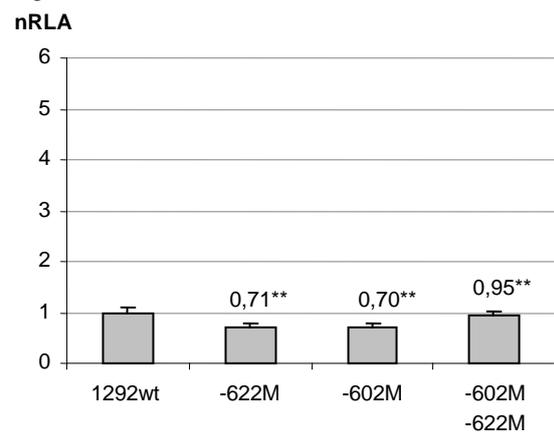


Abb. 35: **A₁/B₁**: Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für den humanen (**A₁**) und bovinen (**B₁**) ECE-1a Promotor. Blaue Boxen stellen evolutionär konservierte Ets-1 Bindungsstellen dar, graue Boxen kennzeichnen weitere Bindungsstellen für Ets-1. Die roten Kreuze markieren die hier verwendeten mutierten Bindungsstellen. Die mit ATG beschriftete Box stellt das Startcodon für das ECE-1a Transkript dar. **A₂/B₂**: Darstellung der Aktivität des humanen (**A₂**) und bovinen (**B₂**) ECE-1a Promotors in EA.hy926 unter Verwendung von mutierten Bindungsstellen auf dem Konstrukt 1209wt (**A₂**) bzw. 1292wt (**B₂**). **A₃/B₃**: Darstellung der Aktivität des humanen (**A₃**) und bovinen (**B₃**) ECE-1a Promotors in CHO-Zellen. Auf der y-Achse ist die normalisierte, relative Luciferaseaktivität angegeben (nRLA). Auf der x-Achse sind die verwendeten Konstrukte aufgetragen, dabei steht wt für Wildtyp und M für Mutante. Der Wert über den Balken gibt die relative Aktivität zum ersten Konstrukt in der Abb. an (1209wt bzw. 1292wt), die jeweils auf den Wert 1,0 gesetzt wurden. ** bedeutet eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Wildtypen (wt).

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von multiplen Bindungsmotiven für Proteine der ETS-Familie bei der Regulierung des ECE-1a Promotors näher untersucht. Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Beobachtung, dass die Bindungsstelle, über die rekombinant exprimiertes Ets-1 den humanen ECE-1a Promotor aktiviert, mithilfe von Punktmutationen nicht eindeutig identifiziert werden konnte und stattdessen Hinweise auf repressorische ETS-Proteine gefunden wurden (Orzechowski et al., 2001). Es wurde der Einfluss des rekombinant exprimierten Transkriptionsfaktors Ets-1 auf den Promotor mittels Reporterassays systematisch analysiert und es wurde die funktionelle Bedeutung der multiplen Konsensussequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie untersucht. Dabei wurden zell- und speziesspezifische Unterschiede in der Regulation des ECE-1a Promotors aufgezeigt.

Die am Anfang dieser Arbeit durchgeführten computerbasierten Analysen ergaben für den Transkriptionsfaktor Ets-1 eine Reihe evolutionär konservierter, putativer Bindungsstellen, wobei nicht angenommen werden kann, dass die gefundenen Sequenzen selektiv nur die Bindung von Ets-1 zulassen. Vielmehr muss man davon ausgehen, dass auch andere ETS-Proteine an die Sequenzen binden können. Diese ETS-Motive wurden systematisch via Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) untersucht. Interessanterweise variierte für jede Bindungsstelle das beobachtete EMSA-Bandenmuster. Daher sollte zunächst die mögliche Bedeutung der verschiedenen Spleißvarianten von Ets-1 und im Weiteren die mögliche Bedeutung von anderen ETS-Proteinen diskutiert werden.

6.1 Protein-DNA Interaktion von ETS-Proteinen mit dem ODN cEts-1

Um möglichst alle Spleißvarianten zur Darstellung zu bringen, wurde der in Abbildung 12 dargestellte Versuchsaufbau mit dem ODN cEts-1 gewählt, welches die bereits in der Literatur nach Hultgardh-Nilsson (1996) beschriebene Ets-1 Konsensussequenz enthält.

Das Protein Ets-1 liegt in vier bisher bekannten Spleißvarianten vor (p51, p48, p42, p39) (Koizumi et al., 1990). Ets-1 p52 und p49 stellen phosphoryliertes p51 bzw. phosphoryliertes p48 dar. Die Isoformen p49, p48, p42 und p39 treten hauptsächlich nukleär auf, die Isoformen p52 und p51 im Zytoplasma.

Die Bindung an das ODN cEts-1 zeigte fünf verschiedene, spezifische Banden. Postuliert man, dass die Spleißvariante p49 in aktivierter Form vorliegt und somit die Möglichkeit besitzt, an die DNA zu binden, lassen sich vier der fünf Banden erklären (durch p49, p48, p42 und p39).

Da im Gelshift die Protein-DNA-Komplexe nach Ladung und Größe aufgetrennt werden, entsprechen die Banden B1 und B2 wahrscheinlich den Isoformen p49 und p48 und die weiter unten liegenden Banden B3 bis B5 vermutlich p42 und p39.

Es gibt nun prinzipiell drei Möglichkeiten für eine Erklärung des Auftauchens der fünften Bande. Erstens handelt es sich möglicherweise um eine bisher noch nicht bekannte Isoform von Ets-1. Zweitens wäre auch denkbar, dass eine Isoform zusätzlich mit einem anderen Transkriptionsfaktor einen größeren Komplex eingeht, der sich dann im Gel als eine Bande darstellt, die nicht so weit läuft wie der Transkriptionsfaktor alleine. Es ist bekannt, dass es zahlreiche Möglichkeiten gibt, die DNA-Bindung von Ets-1 durch Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren zu erleichtern. Die Arbeitsgruppe Sharrocks et al. hat beschrieben, dass die im Kern vorkommenden Isoformen p49 und p48 die Region D in ihrer Proteinsequenz enthalten und somit in einem Zustand vorliegen können, in dem die DNA-Bindung aufgrund von einer autoinhibitorischen Konformation nicht möglich ist. Die Komplexbildung mit dem Transkriptionsfaktor CBP/p300 führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht die Bindung von Ets-1 an die DNA (Sharrocks et al., 2001). Ebenso kann die Affinität von Ets-1 zur DNA-Bindungssequenz durch Komplexbildung mit anderen Faktoren wie c-Jun und bHLH erhöht werden (Sharrocks et al., 1997). Drittens wäre auch möglich, dass es sich um einen anderen Transkriptionsfaktor der ETS-Familie handelt, der an dieses Oligonukleotid binden kann, aber noch nicht bekannt ist, und der nach dem Prinzip einer kompetitiven Verdrängung einen Teil der Oligonukleotide besetzt.

Da die Bande in Spur 7 mit rekombinant hergestelltem Ets-1 Protein in gleicher Höhe lag wie die Bande B2 unter Einsatz von Kernproteinen und diese Bande bei Einsatz des Antikörpers auch schwächer wurde und sich gleichzeitig eine *Supershift*bande zeigte (Spur 9), muss es sich bei diesem Komplex um ein ETS-Protein handeln. Dieses Ets-Protein ist entweder Ets-1 oder ein ETS-Protein mit der gleichen Molekularmasse wie Ets-1. Diese Bande ist im Vergleich zu den anderen Banden auch diejenige mit der stärksten Intensität. Sie stellt somit höchstwahrscheinlich die Hauptisoform von Ets-1 dar. Geht man davon aus, dass es sich um Ets-1 handelt,

könnte das bedeuten, dass die p48-Isoform in der humanen Zelllinie EA.hy926 die hauptsächlich vorkommende Isoform darstellt.

6.2 Protein-DNA Interaktion von ETS-Proteinen mit ETS- Motiven des ECE-1a Promotors

In dieser Arbeit wurden alle evolutionär konservierten Bindungsstellen des ECE-1a Promotors im EMSA untersucht. Es lassen sich zunächst Aussagen treffen, die auf alle Bindungsstellen zutreffen.

In allen Untersuchungen konnte eine spezifische Bindung eines ETS-Proteins sowohl unter basalen Bedingungen (DMSO-Kontrollzellen), als auch unter Stimulation mit TPA nachgewiesen werden. Dieses leitet sich daraus her, dass das verwendete Antiserum spezifisch für die Klasse der ETS-Proteine detektiert (J. Hagman, persönliche Mitteilung). Weiterhin lagen die *Shift*banden und *Supershift*banden mit DMSO-Kontrollzellen immer auf der gleichen Höhe, wie die der stimulierten Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass unter Stimulationsbedingungen immer ein ETS-Protein mit ungefähr gleicher Molekulargröße wie unter basalen Bedingungen an eine ETS-Bindungsstelle bindet. Dies kann theoretisch ein Transkriptionsfaktor der ETS-Familie mit ähnlicher Molekülgröße sein oder eine andere Isoform des gleichen ETS-Familienmitglieds.

Western Blot Analysen mit EA.hy926 und HMEC haben gezeigt, dass Ets-1 bereits konstitutiv in diesen Zellen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt), aber nach TPA-Stimulierung stärker exprimiert wird. Es fällt auf, dass im EMSA unter TPA-Stimulierung das gleiche Bandenmuster vorliegt wie bei DMSO-Kontrollzellen, nur dass die Banden intensiver auftreten, was die Western Blot Analyse bestätigt.

In jedem Versuch wurde als Positivkontrolle ein rekombinant hergestelltes Ets-1-Protein eingesetzt. Daher konnte das Bandenmuster der Kernproteine mit der Laufhöhe der *Shift*bande von Ets-1 immer direkt verglichen werden. Die vom rekombinant hergestellten Ets-1-Protein abstammende Bande war in jedem Versuch in ihrer Laufhöhe identisch mit einer Bande im Muster der Kernproteine. Ausnahmen bildeten die Bindungsstellen -226 und -787. Bei der Bindungsstelle -226 (Abb. 14) waren wahrscheinlich aufgrund geringer Beladungsintensität der Taschen die *Shift*banden nicht zu erkennen. Bei der Bindungsstelle -787 (Abb. 18) wurde kein rekombinantes Ets-1 Protein verwendet.

Für alle untersuchten ETS-Motive ließ sich unabhängig von den Kernproteinen die Bindungsmöglichkeit des Transkriptionsfaktors Ets-1 mittels *Supershift*banden mit rekombinant hergestelltem Ets-1 nachweisen. Diese lief jedoch in jedem Versuch auf unterschiedlicher Laufröhre im Vergleich zu den *Supershift*banden der Kernproteine. Dazu gibt es drei Erklärungsmöglichkeiten. Erstens besteht die Möglichkeit, dass bei Herstellung des rekombinanten Ets-1 durch proteolytische Spaltung Komplexe mit kleinerer Molekularmasse entstehen. Bei genauer Betrachtung war in den *Supershifts* mit rekombinantem Ets-1 auf der gleichen Höhe wie bei den Kernproteinkomplexen eine Bande zu erkennen, die sich weiter hinunter zog. Zweitens ist es möglich, dass Ets-1 im Kernproteingemisch mit anderen Transkriptionsfaktoren Komplexe bildet, oder drittens, dass ein bisher unbekanntes ETS-Familienmitglied, welches vom verwendeten ETS-Antiserum detektiert wird, an die ETS-Konsensus Motive bindet.

6.3 Die ETS-Bindungsstellen des humanen ECE-1a Promotors im Vergleich

Interessanterweise unterschieden sich die untersuchten ETS-Konsensussequenzen in dem im Gel auftretenden Bandenmuster voneinander. Es wäre daher möglich, dass die flankierenden DNA-Motive der ETS-Bindungsstellen bestimmte Ets-1-Isoformen mit höherer Affinität binden als andere, und somit zu einer differenzierten Regulation des ECE-1a Promotors führen. Zusätzlich kann ein nicht identifiziertes ETS-Familienmitglied an bestimmte ETS-Konsensussequenzen binden.

In Western Blot Analysen konnte in den humanen Endothelzellen EA.hy926 unter Stimulation mit TPA ein Anstieg der Ets-1-Isoformen p48 und p49 im Nukleus beobachtet werden, während die Isoformen p42 und p39 kaum oder gar nicht beeinflusst wurden. EA.hy926-Zellen zeigten ohne Stimulation mit TPA eine geringe Konzentration an Ets-1-Protein und wiesen eine geringe Expression von ECE-1a mRNA auf (Orzechowski et al., 2001). Dies liegt mit grosser Wahrscheinlichkeit daran, dass die Spleißvarianten p48 und p49 in einer Konformation vorliegen, in der sie zunächst nicht an die DNA binden können. Erst die Dephosphorylierung der D-Domäne oder die Bindung eines Koaktivators machen die DNA-Bindung möglich. Den Spleißvarianten p42 und p39 fehlt diese Domäne, so dass sie jederzeit an die DNA binden können. Dies könnte bedeuten, dass die Ets-1-Isoformen p42 und p39 für eine geringe Grundaktivität des Promotors sorgen und an bestimmte ETS-Konsensussequenzen bevorzugt binden. Die Isoformen p48 und p49 regulieren höchstwahrscheinlich unter Stimulation mit TPA die Aktivität des ECE-1a

Promotors hoch. Dazu werden sie entweder nahe der *Pointed*-Domäne phosphoryliert oder bilden möglicherweise Komplexe mit Koaktivatoren aus, die die autoinhibitorische Formation aufheben.

Unterschiede zwischen den einzelnen ETS-Bindungsstellen bestanden zum Ersten in der Anzahl der erzeugten Banden in den Gelshiftversuchen. Zum Zweiten wurden die Proben so aufgetragen, dass in einem Gel immer DMSO-Kontrollzellen direkt mit TPA-stimulierten Zellen verglichen werden konnten. Auch hier bestanden Unterschiede in der Intensität.

Dabei nimmt die Bindungsstelle -659 eine besondere Stellung ein. Vergleicht man die Gelshiftuntersuchungen mit den Transfektionsstudien, so fiel auf, dass nur die Mutation der Bindungsstelle -659 zu einer Abschwächung der Aktivität des humanen ECE-1a Promotors geführt hat (Abbildungen 16 und 31). Die Bindungsstelle -659 war die Einzige, die im EMSA drei spezifische Banden aufwies. Auch hier war die Intensität der Banden insgesamt im Gel bei TPA-Stimulierung intensiver als bei den DMSO-Kontrollzellen. Dazu gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Erstens wäre dies ein weiteres Indiz dafür, dass die Bindung unterschiedlicher Ets-1-Isoformen für die Regulation des humanen ECE-1a Promotors verantwortlich ist. Demnach wäre es möglich, dass die Ets-1-Isoform p42 oder p39 über die Bindung an das Motiv -659 eine basale Aktivität vermittelt und unter TPA-Stimulierung eine andere Ets-1-Isoform mit höherer Affinität bindet, die intensivere Banden hervorruft. Diese kann aber erst unter Stimulationsbedingungen binden (wie im Abschnitt 6.1 dargestellt). Zweitens besteht die Möglichkeit, dass die zusätzliche Bande beim Motiv -659 einer Ets-1-Isoform (p42 oder p39) entspricht, die eine Grundaktivität vermittelt, während die anderen Banden einem Repressor der ETS-Familie entsprechen.

Bei den Bindungsstellen -639 (Abb. 15) und -787 (Abb. 18) konnte man unter DMSO-Bedingungen eine stärkere Intensität sehen, als unter TPA-Stimulation der Zellen. In den Transfektionsstudien stieg bei Mutation dieser Bindungsstellen die Aktivität des Promotors stark an (Abb. 31). Dies könnte darauf hindeuten, dass unter basalen Bedingungen ein repressorisches ETS-Protein mit starker Bindungsaffinität interagiert, während unter TPA-Stimulierung die Bindung schwächer ist, bzw. ein anderes ETS-Protein mit geringerer Affinität bindet. Eine direkte Korrelation zwischen der Basensequenz der flankierenden Sequenzen, der Intensität und Anzahl der Banden und der Funktionalität einer Bindungsstelle lässt sich jedoch nicht herstellen.

6.4 Die Regulierung des bovinen ECE-1a Promotors

Wie im Ergebnisteil beschrieben, besitzen der humane und bovine ECE-1a Promotor mehrere evolutionär konservierte Bindungsstellen für ETS-Transkriptionsfaktoren. Daher kann man schlussfolgern, dass diese Bindungsstellen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Promotors spielen.

Zunächst wurden bereits beschriebene Effekte von Punktmutationen in ETS-Bindungssequenzen des bovinen ECE-1a Promotors bestätigt (Dissertation M. Richter, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin, 2000). Zusätzlich wurden Kombinationsmutationen im vollen Konstrukt hergestellt und der Einfluss auf die Gesamtaktivität des Promotors gemessen.

Wie in Abb. 24B dargestellt, nahm die Promotoraktivität durch Einsatz der multiplen Mutante (mm) fast vollständig ab. Daraus kann man schließen, dass Ets-1 die entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Promotors spielt. Vergleicht man nun die Aktivität bei Mutation einzelner Ets-Konsensussequenzen, lässt sich feststellen, dass einerseits eine weiter 3' gelegene Region mit den Bindungsstellen -241, -211 und -180 und andererseits eine weiter 5' gelegene Region mit dem Tandemmotiv -622/-602 eine wichtige Rolle spielen, da der Promotor in seiner Aktivität stark vom Wildtypkonstrukt abwich. Bei Mutation der Bindungsstelle -211 wies das Konstrukt nur noch eine Aktivität von 32% auf und bei Mutation von zwei Bindungsstellen in diesem Bereich (-211/-180) nur noch von 17%. Interessanterweise aktivierte die Mutation -180 den Promotor leicht, dagegen kam es bei einer Kombination der Mutation -180 mit anderen Mutationen zu einem Abfall der Aktivität. Möglicherweise besitzt diese Bindungsstelle eine negativ-regulierende Funktion. Ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der Transkription des Promotors scheint das Tandemmotiv -622/-602 zu spielen, da bei Mutation die Aktivität des Promotors stark abfiel. Das bovine Tandemmotiv -622/-602 entspricht dem humanen Tandemmotiv -659/-639 (Abb. 11).

6.5 Die Regulierung des humanen ECE-1a Promotors

6.5.1 TPA-Stimulierung / Ets-1 Überexpression und involvierte Signaltransduktionswege

Vergleicht man die Aktivität von Deletionsmutanten des humanen ECE-1a Promotors mit dem Wildtypkonstrukt in Abb. 25B (helle Balken), kann man feststellen, dass bereits bei Einsatz des Konstruktes -498 die Aktivität um fast 90% abfiel, woraus man schließen kann, dass die Tandemotive -659/-639 und -816/-787 auch im humanen Promotor eine entscheidende Rolle spielen. Das Konstrukt -267 wies im Verhältnis zum Konstrukt -498 nur noch einen sehr schwachen Verlust an Aktivität auf. Alle Konstrukte 1209wt, -736 und -498 konnten durch TPA relativ konstant durchschnittlich um den Faktor 1,9 aktiviert werden, während dies beim kürzesten Konstrukt nicht mehr möglich war, woraus man schließen kann, dass im Bereich bis -267 keine durch TPA regulierten ETS-Bindungselemente liegen, die eine entscheidende Rolle spielen.

Durch TPA-Stimulierung konnte in der humanen Zelllinie EA.hy926 ein Anstieg der Ets-1 mRNA, gefolgt von einem Anstieg des Ets-1-Proteins und schließlich der ECE-1a mRNA herbeigeführt werden. Durch Präinkubation mit *Calphostin C*, einem hochselektiven Inhibitor der PKC, ließ sich der Anstieg der Ets-1 mRNA teilweise inhibieren (Orzechowski et al., 2001). Daher war es interessant, den Effekt der TPA-Stimulierung mit dem einer Ets-1-Überexpression direkt zu vergleichen.

Dies wurde in einem Versuch realisiert, der in Abb. 26 dargestellt ist. Dort zeigte sich noch einmal die abnehmende Aktivität des Promotors mit Verkürzung der Deletionsmutanten. Dabei verhielten sich nicht-stimulierte Zellen ähnlich, wie unter Stimulation mit TPA bzw. mit Ets-1. Eine Überexpression von Ets-1 führte jedoch in allen Konstrukten zu einer sehr viel stärkeren Aktivität des Promotors, als durch TPA-Stimulierung (lila versus dunkelgraue Balken). Dies lässt den Schluss zu, dass die Aktivierung des ECE-1a Promotors über den Transkriptionsfaktor Ets-1 nicht nur über Signaltransduktionswege stattfindet, die PKC-vermittelt sind. Dies wird durch die Ergebnisse von Tanaka et al. bestätigt, die zeigen konnten, dass eine Induktion von Ets-1 in ECV304-Zellen nach Verletzung der Zellkultur durch einen Plastikamm ausschließlich durch die MAP-Kinasen JNK und p38 vermittelt wird, welche nicht mit der Proteinkinase C interagieren (Tanaka et al., 1998).

Durch Kostimulation mit TPA und Ets-1 (schwarze Balken) zeigte sich die stärkste Aktivierung des humanen ECE-1a Promotors. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung des Promotors nicht nur über den Transkriptionsfaktor Ets-1 stattfindet.

Die MAP-Kinase Superfamilie setzt sich vor allem aus den Kinasen ERK1/2, JNK (synonym SAPK), ERK5 und p38 zusammen. Die MAP-Kinase-Kinase MEK1/2 ist Teil der Ras-MAP-Kinase-Kaskade und phosphoryliert die MAP-Kinase ERK1/2 (synonym p42/p44^{MAPK}). Diese kann in phosphoryliertem Zustand vom Zytoplasma in den Zellkern übertreten und führt dort zu einer Steigerung des Transaktivierungsverhaltens des Ets-1-Proteins über die Phosphorylierung nahe dessen Pointed-Domäne. Auch die PKC-stimulierte Aktivierung von MAP-Kinasen ist in vielen Zellsystemen beschrieben (Yordy et al., 2000; Gutkind et al., 2000). Eine Induktion von Ets-1 konnte in Endothelzellen durch Stimulierung von VEGF erzielt werden. Diese Induktion ist selektiv über die MAP-Kinase ERK1/2 vermittelt (Sato et al., 2001a). Da die Kotransfektion von TPA-stimulierten EA.hy926-Zellen mit Ets-1 zu einer noch stärkeren Aktivierung des ECE-1a Promotors führte (Abb. 26, schwarze Balken), ist zu vermuten, dass auch noch andere PKC-vermittelte Wege involviert sind.

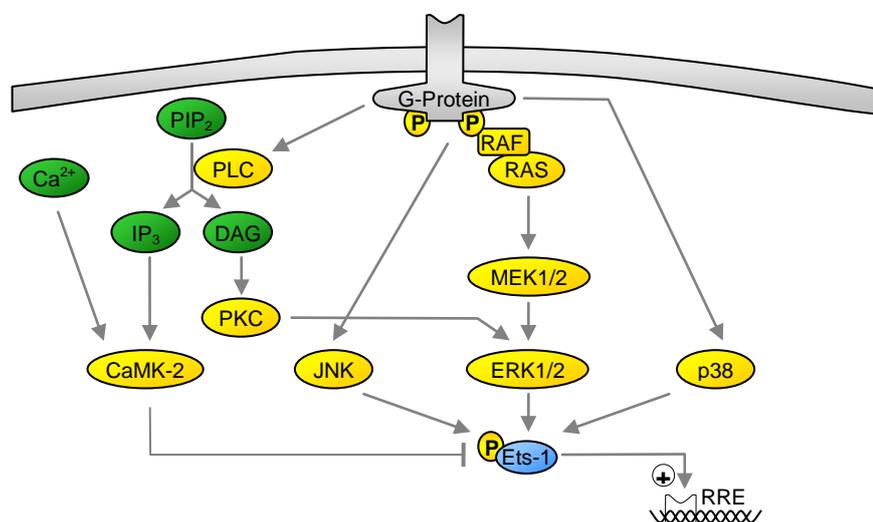


Abbildung 36: Schematische Darstellung der möglichen involvierten Signaltransduktionswege zur Regulation des Bindungsverhaltens des Transkriptionsfaktors Ets-1 über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und intrazelluläres Calcium. Ca²⁺ steht für Calcium, PIP₂ für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PLC für Phospholipase C, IP₃ für Inositoltriphosphat-3, DAG für Diazylglycerin, PKC für Proteinkinase C, CaMK-2 für Calmodulin-abhängige-Proteinkinase-2, Phosphorylierung (P), RAF/RAS für MAPKK-Kinase, MEK1/2 für MAPK-Kinase JNK für c-Jun NH₂-terminale Kinase, ERK1/2 für extrazellulär signal-regulierte Kinase, p38 für eine weitere mitogen-aktivierte Kinase, RRE für Ras-Responsibles Element auf dem mit der Doppelhelix dargestellten DNA-Strang, + bedeutet eine erhöhte Transaktivierungsfähigkeit von Ets-1.

6.5.2 Einfluss einzelner ETS-Bindungsstellen im Kontext unterschiedlich langer Promotorkonstrukte

Die ECE-1a Promotorkonstrukte ließen sich in der makrovaskulären humanen Zelllinie EA.hy926 als auch in der mikrovaskulären Endothelzelllinie HMEC-1 durch TPA stimulieren (Abb. 25 und Abb. 30). Beide Zelllinien exprimieren konstitutiv nur wenig ECE-1a. In EA.hy926 Zellen stellte die Isoform ECE-1a die einzige signifikant durch TPA regulierte dar (Orzechowski et al., 2001).

Mutiert man die **Bindungsstelle -639** im vollen Konstrukt, trat eine starke Aktivierung des humanen Promotors in EA.hy926-Zellen auf (Abb. 27A₂). Mutiert man dagegen die Bindungsstelle -639 in dem verkürzten Konstrukt -736, führte dies zu einem gegenteiligen Effekt mit Verlust an Promotoraktivität. Die Ergebnisse konnten in HMEC-1-Zellen bestätigt werden (Abb. 31B und Abb. 32B).

Betrachtet man die Mutation der Bindungsstelle im Überexpressionsversuch mit Ets-1, trat keine signifikante Aktivierung des Promotors mehr auf (Abb. 28B), wohl aber im verkürzten Konstrukt -736 (Abb. 29B).

Dies lässt die These zu, dass ein Transkriptionsfaktor mit repressorischen Eigenschaften auf die Bindungsstelle -639 bindet. Da im verkürzten Konstrukt -736 ein gegenteiliger Effekt zu sehen war, wie im vollen Promotorkonstrukt, scheint dieser Repressor nur unter Einbeziehung der weiter in 5' gelegenen Richtung binden zu können. Möglicherweise besteht hier ein Komplex aus mehreren Korepressoren, der unter basalen Bedingungen die Aktivität des Promotors unterdrückt.

Die **Bindungsstelle -659** dagegen führte bei Mutation im Kontext mit allen verwendeten Promotorkonstrukten nie zu einer Aktivierung des humanen ECE-1a Promotors. Im vollen Konstrukt sowie im verkürzten Promotorkonstrukt kam es bei Mutation zu einem Verlust an Promotoraktivität. Dies galt für EA.hy926-Zellen und HMEC-1-Zellen (Abb. 27 bis 32). Wie bereits im Abschnitt 6.3 beschrieben, unterschieden sich die Bindungsstelle -659 auch im Gelshift (EMSA) hinsichtlich des Bandenmusters von allen anderen evolutionär konservierten Bindungsstellen mit drei erkennbaren spezifischen Banden. Vermutlich binden an diese Sequenz bevorzugt solche Ets-1-Isoform wie p42 oder p39, welche durch alternatives Spleißen keine D-Region enthalten und somit nicht an der DNA-Bindung gehindert werden können. Diese Isoformen könnten über die Konsensussequenz -659 eine gleich bleibende Grundaktivität vermitteln. Western Blot Analysen haben gezeigt, dass auch unter basalen Bedingungen Ets-1 exprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

Die **Bindungsstellen -816, -787 und -226** zeigten durch Mutation ihrer Sequenz im vollen Konstrukt eine Aktivierung des Promotors in HMEC-1-Zellen (Abb. 31B). Sowohl die Mutation -787 als auch die Mutation -266 führten erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Promotoraktivität im vollen Konstrukt -1209 und den verkürzten Promotorkonstrukten -1180 und -1086.

Bemerkenswert ist, dass das Aktivitätsverhalten des Promotorkonstruktes -964 deutlich von den längeren Promotorkonstrukten divergiert. Weder durch Mutation der Bindungsstelle -787, noch durch Mutation der Bindungsstelle -226 wurde ein signifikanter Aktivitätsanstieg des Promotors erreicht. Da sich das Konstrukt -1209 und die Promotorkonstrukte -1180 sowie -1086 in ihrem Aktivitätsverhalten durch Mutation der einzelnen Bindungssequenzen nur schwach voneinander unterscheiden, kann man annehmen, dass der Bereich zwischen der Position -1086 und -964 eine Interaktion mit anderen Bindungsstellen wie -787 und auch der sehr weit 3' gelegenen Region vermittelt, in der die Konsensussequenz -226 liegt. Dafür kommt die in diesem Bereich liegende **ETS-Bindungsstelle -972** in Frage.

Ein Mechanismus, der über längere DNA-Abschnitte Interaktionen vermittelt und sowohl in Bereichen der Aktivierung als auch der Inhibierung für Promotoren beschrieben ist, ist das so genannte "DNA-looping". Dabei bilden zwei Transkriptionsfaktoren, die in größerer Entfernung an die DNA binden, einen Komplex und führen somit zu einer Ausbildung einer DNA-Schleife (Ogata et al., 2003). Für ETS-Proteine wurde dieser Mechanismus allerdings noch nicht beschrieben.

Die Bildung von Superkomplexen ist für das Protein Ets-1 in der Literatur bereits beschrieben. Ets-1 kann über Protein-Protein-Interaktionen seiner ETS-Domäne einen Komplex mit dem Transkriptionsfaktor Pax-5 bilden (Pufall et al., 2002b). Weiterhin wurde die Bildung eines Superkomplexes, bestehend aus den Komponenten GABP α /GABP β und Ets-1/Pax-5, beschrieben (Ogata et al., 2003). Eine computerbasierte Analyse des humanen ECE-1a Promotors mit der Software *MatInspector* (*Release professional 6.2.2 und MatInspector library: Matrix Family Library version 3.3*) ergab drei putative GABP-Bindungsstellen, von denen zwei im 5' gelegenen Bereich und eine ca. 100 bp *upstream* der Ets-Konsensussequenz -226 anzutreffen sind. Weiterhin konnten mehrere putative Pax-Bindungsstellen identifiziert werden.

6.6 Spezies- und zellspezifische Unterschiede in der Regulation des ECE-1a Promotors

Um spezies- und zellspezifische Unterschiede festzustellen, wurden der humane und bovine ECE-1a Promotor in verschiedene Zelllinien transfiziert, die sich in ihrem primären isoformspezifischen ECE-1 Expressionsmuster unterscheiden.

6.6.1 Betrachtung der verwendeten Zellarten

BAEC

Bovine aortale Endothelzellen sind differenzierte makrovaskuläre Endothelzellen. In der Expression der ECE-Isoformen unterscheiden sie sich stark von EA.hy926-Zellen. Der Stimulation von BAEC mit VEGF folgte ein Anstieg der Isoformen ECE-1b/1c/1d (Matsuura et al., 1997). Nach Stimulation mit TPA wurde in BAEC vermehrt ECE-1b/1c und 1d mRNA exprimiert. Die Expression von ECE-1a mRNA wie auch der Ets-1 mRNA blieb davon weitgehend unbeeinflusst (Dissertation A. Günther, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin, 2002). An BAEC wurde vor allem die Regulation des bovinen ECE-1a Promotors untersucht und Unterschiede zur humanen Spezies aufgedeckt.

EA.hy926

EA.hy926-Zellen wurden hergestellt durch Fusion humaner umbilikalvenöser Endothelzellen (HUVEC) mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549/8. EA.hy926-Zellen weisen Endothel Eigenschaften auf und exprimieren viele endotheliale Gene. Dazu zählen unter anderen Prostacyclin, Gewebs-Plasminogen-Aktivator, -Inhibitor Typ 1 und von-Willebrandt-Faktor (Rieber et al., 1993). Northern- und Western Blot Analysen ergaben, dass in den humanen Endothelzellen EA.hy926 die Isoform ECE-1a die durch PKC-Aktivierung regulierbare Isoform darstellt (Orzechowski et al., 2001).

CHO

Bei CHO-Zellen (chinese hamster ovary) handelt es sich um epithelähnliche eukaryonte Zellen, die konstitutiv keine ECE-Aktivität aufweisen (Schweizer et al., 1997). Untersuchungen an diesen Zellen sind dazu geeignet, um Unterschiede der Regulation zu humanen Zelllinien aufzudecken.

ECV304

ECV304-Zellen (ECACC, Salisbury) galten ursprünglich als spontan transformierte HUVEC (humane umbilikalvenöse Endothelzellen) (Takahashi et al., 1990). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde jedoch aufgedeckt, dass eine Kreuzkontamination mit der humanen epithelialen Zelllinie EJ1/T24 vorlag (Brown et al., 2000). Konstitutiv exprimieren diese Zellen wenig ECE-1a. ECE-1b und 1c stellen hier die dominanten Isoformen dar (Schweizer et al., 1997).

HMEC

HMEC-Zellen (human dermal microvascular endothelial cells) wurden 1992 von der Gruppe Edwin et al. durch Transfektion mit einem Plasmid immortalisiert, welches eine Sequenz enthält, die für einen Teil des Simian Virus 40 A kodiert. Es entstand die Zelllinie CDC/EU.HMEC-1 (Ades et al., 1992). Die Expression der ECE-Isoformen ist ähnlich wie in EA.hy926-Zellen. HMEC-Zellen zeichnen sich im Vergleich zu EA.hy926 durch eine bessere Transfizierbarkeit aus.

H9c2

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um Kardiomyoblasten der Ratte, die von der Rattenherzlinie BD1X abstammen (Kimes et al., 1976). Während die Isoform ECE-1c konstitutiv exprimiert wird, konnten die Isoformen ECE-1a und ECE-1b in der Ribonuklease-Protektionsanalyse (RPA) nicht detektiert werden (Funke-Kaiser et al., 2003).

6.6.2 Das Verhalten des humanen Promotors in verschiedenen Zellarten

Zunächst wurde der humane ECE-1a Promotor in verschiedene Zellarten transfiziert und das Aktivitätsverhalten des Promotors bei Mutation des wichtigen Tandemmotivs -659/-639 untersucht (Abb. 34). Dabei ähnelte sich das Promotorverhalten in den humanen Zelllinien EA.hy926, HMEC-1, H9c2 und ECV304. Die Mutation der Bindungsstelle -639 führte zu einer gesteigerten Aktivität, ebenso wie die Doppelmutation des Tandemmotivs. Durch Mutation der Bindungsstelle -659 nahm in allen Zelllinien die Aktivität des Promotors ab. Vermutlich wird in diesen Zelllinien die Aktivität des Promotors, wie bereits erläutert, durch einen Repressor unterdrückt.

Einen entscheidenden Unterschied stellte die bovine Spezies dar. Man sah ein ähnliches Ergebnis wie bei einer Transfektion des bovinen Promotors in BAEC. In BAEC wurde gezeigt, dass die mRNA der ECE-Isoformen b/c/d durch TPA

stimulierbar ist, während dieser Effekt für die ECE-1a mRNA nur unbedeutend war (Dissertation A. Günther, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität Berlin, 2002). In diesem Fall wäre die Bindung eines Repressors an den ECE-1a Promotor nicht sinnvoll.

6.6.3 Das Verhalten des bovinen Promotors in verschiedenen Zellarten

Transfiziert man dagegen den bovinen Promotor in verschiedene Zellarten und vergleicht dies mit dem humanen Promotor, lässt sich ein deutlicher Unterschied erkennen. Der bovine Promotor verhielt sich im Gegensatz zum humanen Promotor in nicht bovinen Zelllinien bei Mutation der einzelnen Bindungsstellen stringent. Die Mutationen -602, -622 und -602/-622 führten in CHO-Zellen und EA.hy926-Zellen ebenso wie in BAEC zu einer Abnahme der Aktivität. Es gab lediglich Unterschiede in der Gesamtaktivität. Dies deutet darauf hin, dass es dem in EA.hy926-Zellen postulierten Repressor nicht möglich ist, an den bovinen Promotor zu binden.

6.6.4 Subzelluläre Lokalisation der ECE-1 Isoformen im Kontext der isoformspezifischen Regulierung

Die Zelllinien BAEC und EA.hy926 unterscheiden sich vor allem in der subzellulären Lokalisation der ECE-1 Isoformen. Während in BAEC die Isoform ECE-1a vor allem im Bereich des Golgi-Apparates lokalisiert ist und für die intrazelluläre Umsetzung von big ET-1 zuständig ist, ist die ECE-1b Isoform an der Zellmembran lokalisiert und funktioniert als Ektoenzym (Emoto et al., 1999). In humanen Endothelzellen befindet sich dagegen die Isoform ECE-1a an der Zellmembran und die Isoform ECE-1b im Bereich des Golgi-Apparates (Valdenaire et al., 1999; Schweizer et al., 1997). Somit nimmt die Isoform ECE-1a in bovinen und humanen Endothelzellen verschiedene Aufgaben wahr. Im Bereich des Golgi-Apparates findet höchstwahrscheinlich ein basaler Umsatz von ET-1 statt und an der Zellmembran ist eine regulierbare ECE-Isoform aufgrund möglicher schnell anflutender Spiegel von big ET-1 notwendig. Dies stellt einen Hinweis auf eine unterschiedliche Regulation der ECE-1a Promotoren in den beiden Spezies dar.

Die Ergebnisse belegen, dass deutliche Unterschiede zwischen den humanen Zelllinien und der bovinen Zelllinie in der Regulation des ECE-1a Promotors bestehen. Dabei besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisation der ECE-1 Isoformen und der isoformspezifischen Promotorregulation. Die Unterschiede erklären sich zum einen durch die verschiedenen DNA-Sequenzen der Promotoren, zum anderen vermutlich durch

unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden. Unterschiede zwischen humanen mikrovaskulären und humanen makrovaskulären Zelllinien treten in Bezug auf die Quantität der Aktivität auf, nicht jedoch in Bezug auf die Qualität hinsichtlich Aktivierung oder Inhibierung bei Mutation einer Bindungsstelle.

6.7 Identifizierung des Repressors und mögliche Modelle der De-Repression

Zwei theoretische Modelle für die Regulation des humanen ECE-1a Promotors durch ETS-Proteine werden nachfolgend postuliert. Erstens kann es sich bei dem angenommenen Repressor um ein anderes ETS-Protein als Ets-1 handeln. Im Grundzustand würde der ETS-Repressor als Komplex an den Promotor binden und nach Induktion von Ets-1 würde dieses als Aktivator den Repressor verdrängen. Abbildung 37 zeigt das erste Modell der De-Repression.

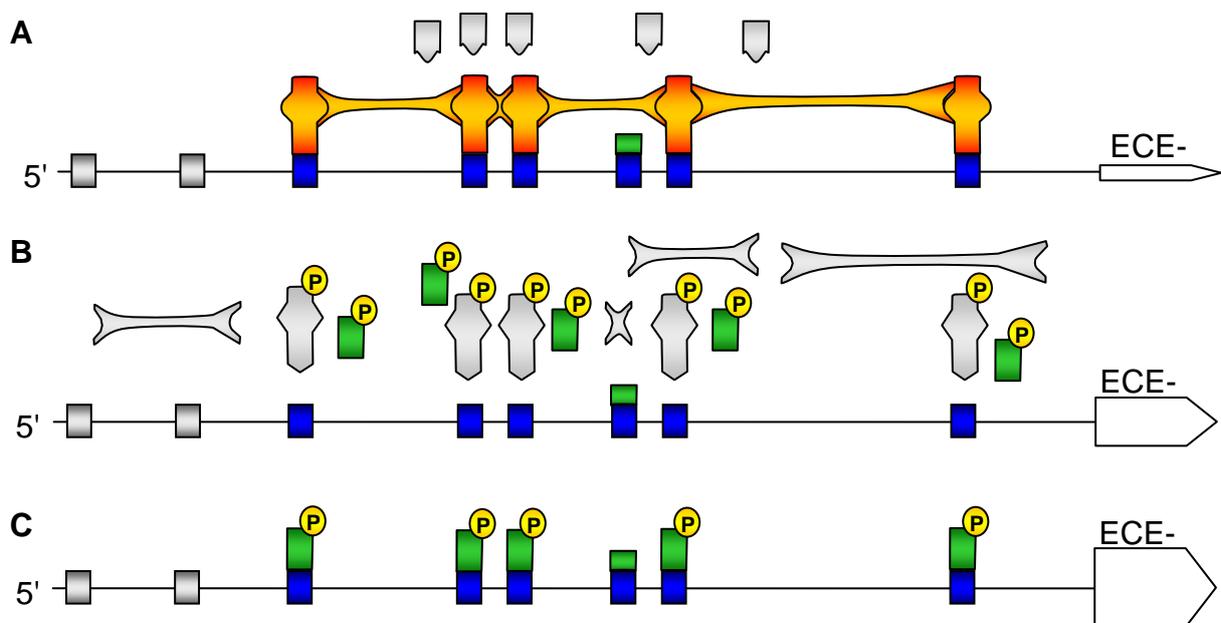


Abbildung 37: Modell einer möglichen De-Repression des humanen ECE-1a Promotors. **A:** Die rot markierten Korepressoren verhindern durch Bindung an die DNA die grau dargestellten Ets-1 Isoformen daran, an die blau markierten ETS-Konsensussequenzen (dunkelblau) zu binden. Die kleine grüne Box stellt eine Spleißvariante von Ets-1 dar (p39 oder p42) und vermittelt eine Grundaktivität. **B:** Durch Phosphorylierung (P) ändern die Korepressoren ihre Konformation, wodurch sich der Superkomplex auflöst (jetzt grau dargestellt). **C:** Die Isoformen von Ets-1 (grüne grosse Boxen) werden phosphoryliert und erhöhen somit ihr Transaktivierungsverhalten. Der Promotor wird aktiviert.

Bei der zweiten Variante existiert ein ETS-Protein, welches in einer aktivierenden und eine repressorischen Isoform vorliegt. Dabei könnte es sein, dass es sich bei dem Repressor um eine bisher unbekannte Spleißvariante von Ets-1 handelt oder ein anderes ETS-Protein. In diesem zweiten Modell werden die aktuellen

Anforderungen über Koaktivatoren und Korepressoren durch Komplexbildung an die Isoformen vermittelt.

In Abb. 12 zeigte sich im EMSA mit dem ODN cEts-1 eine zusätzliche Bande, die mit den bisher bekannten Isoformen nicht zu erklären ist. Unter Einbeziehung dieses Versuches sind prinzipiell beide theoretischen Erklärungsmodelle möglich. Abbildung 38 zeigt das zweite Modell der De-Repression.

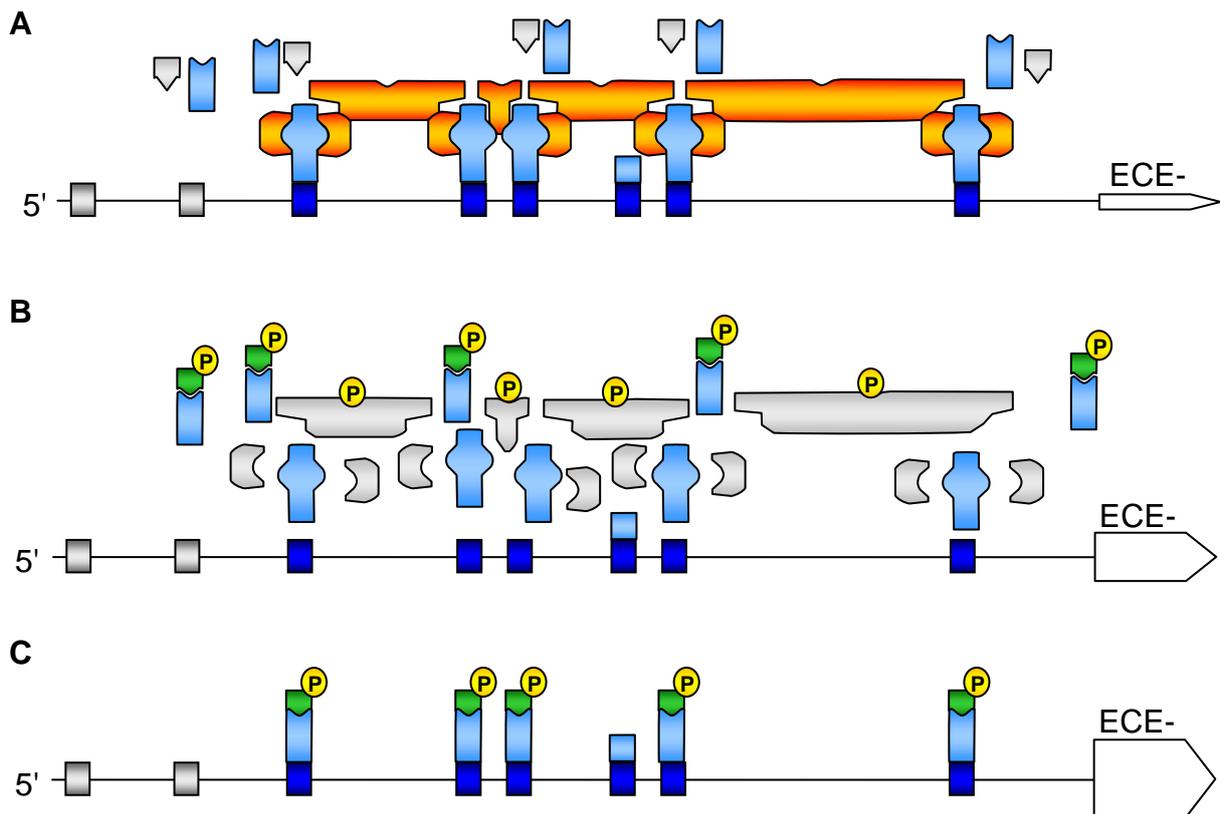


Abbildung 38: Modell einer möglichen De-Repression des humanen ECE-1a Promotors. **A:** Die rot markierten Korepressoren bilden mit hellblau markierten Proteinen (repressorische Isoform) Superkomplexe aus und verhindern dadurch eine Aktivierung des Promotors. Die kleine hellblaue Box stellt eine Spleißvariante von Ets-1 dar (p39 oder p42) und vermittelt eine Grundaktivität. **B:** Durch Phosphorylierung (P) ändern die Korepressoren ihre Konformation, wodurch sich der Superkomplex auflöst (jetzt grau dargestellt). **C:** Die Koaktivatoren (grün dargestellt) werden nun ebenfalls phosphoryliert und ändern ihre Konformation. Sie sind dadurch in der Lage, mit den hellblau markierten Proteinen (aktivierende Isoform) Komplexe zu bilden und an die ETS-Konsensussequenzen (dunkelblau) zu binden. Der Promotor wird aktiviert.

Das erste Modell ist für die Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren unter anderem bei der Entwicklung des Auges der *Drosophila melanogaster* beschrieben. Hierbei wirken die zwei Transkriptionsfaktoren *Pointed* und *Yan* antagonistisch. Dabei führt die Phosphorylierung des Repressors *Yan* durch eine MAP-Kinase zu einem Export des Faktors aus dem Nukleus in das Zytoplasma und zu einer dort lokalisierten,

nachfolgenden Inaktivierung. Die Spleißvariante *PntP1* des Aktivators *Pointed* wird durch den gleichen MAP-Kinase-abhängigen Signalweg phosphoryliert und weist daraufhin eine erhöhte transaktivatorische Kapazität auf (Yordy et al., 2000). Theoretisch kommen die ETS-Faktoren Lin-1, Yan, TEL, TEL-2 und ERF für das erste Modell in Frage, da sie als reine Repressoren beschrieben wurden (Sharrocks et al., 1997; Sharrocks et al., 2001). In Betracht kommen allerdings nur TEL und TEL-2, da nur diese bisher in Endothelzellen nachgewiesen wurden (Sato et al., 2001a).

Für das zweite Modell existiert eine Vielzahl von Kofaktoren, die unter Komplexbildung mit Ets-1 entweder aktivierende oder inhibitorische Eigenschaften vermitteln. Durch die Bindung von einzelnen Faktoren wie AP-1, Myb, Pax-5, NF κ B, AML-1/CBF α 2, Tax1, Sp1, CBP/p300, USF-1 oder Pit-1/GHF-1 kann die aktivierende Wirkung von Ets-1 verstärkt werden, durch Komplexbildung mit den Faktoren MafB, Pit-1 β /GHF-2 oder EAP1/Daxx kann Ets-1 inhibitorisch wirken (Li et al., 2000a; Sharrocks et al., 2001). Die Expression von Prolactin bei Ratten ist durch TRH (Thyrotropin-releasing Hormon) vermittelt. TRH aktiviert ein G-Protein gekoppelten Rezeptor, der die Phospholipase C aktiviert und über eine Ras-MAP-Kinase abhängige Kaskade zu einer Phosphorylierung von Ets-1 führt. Ets-1 bildet unter diesen Umständen mit dem Faktor Pit-1/GHF-1 einen Komplex, der an ein Ras-responsives Element (RRE) auf dem Prolactin Promotor der Ratte (PRL) bindet und aktivierend auf die Transkription wirkt (Yordy et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung von Ets-1 mit dem Faktor Pit-1 β /GHF-2, einer alternativen Spleißvariante von Pit-1, zu einer Inhibition der PRL-Promotorfunktion führt (Wasylyk et al., 1998).

Der *blk*-Promotor von B-Zellen wird hauptsächlich von zwei Isoformen des ETS-Transkriptionsfaktors NERF reguliert. Unter Einbeziehung des Mediators AML-1 wirkt die Isoform NERF-2 aktivierend und die Isoformen NERF-1a und NERF-1b wirken inhibitorisch auf die Transkription des *blk*-Gens (Cho et al., 2004). Für Ets-1 wurde ebenfalls eine Interaktion mit AML-1 beschrieben. Die Isoformen p52, p51, p49 und p48 von Ets-1 liegen in einer autoinhibitorisch wirkenden Konformation vor, wenn sie nicht an die DNA gebunden haben. Durch die Bindung von AML-1 wird diese Konformation geändert und es kann eine DNA-Bindung stattfinden. Neuere computerbasierte Analysen deuten darauf hin, dass die DNA-Bindungssequenzen von Ets-1 und NERF sich stark ähneln. In T-Zellen führt die Inaktivierung des Ets-1

Gens zur Zellapoptose. Dagegen induziert die Spleißvariante p42 die Apoptose in humanen Kolonkarzinomzellen (Sato et al., 2001b). Dies könnte darauf hindeuten, dass verschiedene Expressionsmuster von Ets-1-Isoformen zu gegensätzlicher transkriptioneller Regulation führen können.

6.8 Therapeutischer Ausblick

Aufgrund seiner pathophysiologischen Bedeutung stellt die Hemmung des Endothelinsystems eine therapeutische Option dar. Als direkte pharmakologische Zielstrukturen kommen dabei vor allem die Endothelin-Rezeptoren und das Endothelin Konversionsenzym (ECE-1) in Betracht. Als indirekter Ansatz einer Beeinflussung der Expression von ECE-1 ist eine Hemmung von Transkriptionsfaktoren denkbar, welche an der Transkription der ECE-1 mRNA beteiligt sind, wie z.B. E2F (Funke-Kaiser et al., 2003) oder Ets-1 (Orzechowski et al., 2001).

Bisher wurden bereits eine Vielzahl von ET-Rezeptorantagonisten sowie natürliche und synthetische ECE-Inhibitoren entdeckt und entwickelt, von denen allerdings erst wenige in klinischen Studien umfangreich getestet wurden. Aufgrund pathophysiologischer Mechanismen besitzen ET-Rezeptorantagonisten Potential bei der Behandlung der essentiellen Hypertonie, der pulmonalen Hypertonie, der Myokardischämie und der kongestiven Herzinsuffizienz. Für die Behandlung der pulmonalen Hypertonie sind aufgrund ihrer nachgewiesenen Wirksamkeit inzwischen der nichtselektive ET-Rezeptorblocker *Bosentan* (Rubin et al., 2002) und der selektive ET_A-Antagonist *Sitaxsentan* zugelassen (Galie et al., 2004). Bei der kongestiven Herzinsuffizienz Grad NYHA II bis III konnte in der *EARTH*-Studie kein zusätzlicher Nutzen für den selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten *Darusentan* gezeigt werden (Anand et al., 2004; Kirchengast et al., 2005). Diese Human-Studien widersprechen tierexperimentellen Untersuchungen, was möglicherweise durch das fundamental unterschiedliche Studiendesign zu erklären ist. Dabei wurde *Darusentan* zusätzlich zu einer bestehenden Therapie beim Menschen gegeben, während beim Tier eine Placebo-kontrollierte Untersuchung stattfand. Aus ethischen Gründen ist eine Placebo-kontrollierte Studie natürlich nicht durchführbar.

Unterschiedlich selektive Hemmstoffe des ECE-1 sind verfügbar und zeigten tierexperimentell die für eine Hemmung des ET-Systems erwarteten Effekte. Dabei wurde der Dreifach-Vasopeptidase-Inhibitor *CGS 35601* (ACE, NEP, ECE) mit der selektiven Hemmung von ACE bzw. von NEP im spontan hypertensiven

Rattenmodell verglichen, bzw. mit der Kombinationshemmung von ACE und NEP. Dabei zeigte *CGS 35601* die stärkste blutdrucksenkende Wirkung (Daull et al., 2005). Eine klinische Prüfung am Menschen wurde bisher jedoch noch nicht durchgeführt.

Für eine gezielte Beeinflussung der Promotor-Transkriptionsfaktor-Interaktion stellen sogenannte Decoy-Oligonukleotide einen relativ neuen therapeutischen Ansatz dar. Tierexperimentelle Untersuchungen am Modell der Intimahyperplasie beim Kaninchen zeigten eine signifikante Verminderung der Intimahyperplasie in autologen, venösen Bypässen durch Einsatz von *Edifoligide*, einem Decoy-Oligonukleotid, dass E2F-Proteine bindet (Ehsan et al., 2001). In den PREVENT-III und -IV Studien wurde jedoch kein signifikanter Vorteil gegenüber Placebo in der klinischen Anwendung festgestellt (Conte et al., 2006; Alexander et al., 2005). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Isoform E2F-3 zu einer Induktion der Intimahyperplasie führen kann, während jedoch die Isoform E2F-4 einen genau gegenteiligen Effekt hat und sich beide Effekte aufheben (Giangrande et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch die Hemmung der Bindung von konkurrierenden repressorischen ETS-Transkriptionsfaktoren an den ECE-1a Promotor zu einer unerwarteten aktivierenden Wirkung kommen kann, sodass es momentan aufgrund der ungenügenden Kenntnisse der komplexen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Transkriptionsfaktoren und der damit verbundenen unzureichenden Kenntnis von Risiken und Nebenwirkungen zur Zeit noch nicht möglich ist, gezielt pharmakologische Substanzen einzusetzen, die die Wirkung von Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie beeinflussen.

Ein weiterer wichtiger Schritt in Folge dieser Arbeit wäre die genaue Identifikation des bisher unbekanntem, postulierten Repressors. Dies könnte das Verständnis der direkten Inhibition von ETS-Transkriptionsfaktoren erweitern.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden nach computerbasierter Analyse alle putativen, evolutionär konservierten Bindungsstellen des humanen und bovinen ECE-1a Promotors für den Transkriptionsfaktor Ets-1 bzw. für basal exprimierte ETS-Transkriptionsfaktoren durch das Gelshiftverfahren (EMSA) untersucht. Dabei konnte für die humanen Konsenssequenzen -226, -639, -659, -787, -816, -972 und für die bovinen Konsenssequenzen -602 und -622 eine Bindung eines basal exprimierten ETS-Transkriptionsfaktors gezeigt werden.

Um das Verhalten des ECE-1a-Promotors zu untersuchen, wurden die nativen Bindungssequenzen in Transfektionsstudien nach Einbringung von Mutationen funktionell analysiert. Gemeinsam mit den Ergebnissen der Protein-DNA-Interaktionsstudien mittels EMSA konnte die Wirkung der Mutation der jeweiligen Bindungsstellen funktionell charakterisiert werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression der humanen Isoform ECE-1a in der Endothelzelllinie EA.hy926 unter basalen Bedingungen durch die Bindung eines Repressors an den Promotor reguliert wird. Die bovine ECE-1a Isoform wird hingegen nicht durch einen Repressor reguliert, wie Transfektionsstudien an bovinen aortalen Endothelzellen (BAEC) zeigen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zur Vermittlung der inhibitorischen Wirkung des Repressors Wechselwirkungen zwischen der im 5'-Bereich des Promotors gelegenen Region (-1086 bis -964) und anderen Regionen des Promotors notwendig sind (-787, -226). Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung des Repressors unter Bildung von Komplexen mit weiteren Proteinen stattfindet. Zur Identifizierung des Repressors und dem zugrunde liegenden Mechanismus der Inhibition wurden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Es handelt sich unter Einbeziehung der bekannten Literatur entweder um eine unbekannte Spleißvariante von Ets-1 oder ein anderes ETS-Protein, möglicherweise NERF-1.

Die vorliegende Arbeit erweitert das Verständnis der isoformspezifischen Regulierung von Promotoren. Es wurden Unterschiede in Bezug auf die humane und bovine Spezies dargestellt. Ein weiterer Schritt wäre die Identifikation des bisher unbekanntes, postulierten Repressors, um das Verständnis der direkten Inhibition von ETS-Transkriptionsfaktoren zu erweitern.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, et al. (1992): Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 20 (1): 89-95.

Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. (1992): HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99 (6): 683-90.

Anand I, McMurray J, Cohn JN, et al. (2004): Long-term effects of darusentan on left-ventricular remodelling and clinical outcomes in the Endothelin Receptor Antagonist Trial in Heart Failure (EARTH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 364 (9431): 347-54.

Arai H, Nakao K, Takaya K, et al. (1993): The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem* 268 (5): 3463-70.

Attina T, Camidge R, Newby DE, et al. (2005): Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91 (6): 825-31.

Ayoubi TA and Van De Ven WJ (1996): Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb J* 10 (4): 453-60.

Azuma H, Hamasaki H, Niimi Y, et al. (1994): Role of endothelin-1 in neointima formation after endothelial removal in rabbit carotid arteries. *Am J Physiol* 267 (6 Pt 2): H2259-67.

Azuma H, Hamasaki H, Sato J, et al. (1995): Different localization of ETA and ETB receptors in the hyperplastic vascular wall. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 (5): 802-9.

Barton M (2000): Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. *Curr Hypertens Rep* 2 (1): 84-91.

Barton M, d'Uscio LV, Shaw S, et al. (1998a): ET(A) receptor blockade prevents increased tissue endothelin-1, vascular hypertrophy, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 31 (1 Pt 2): 499-504.

Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, et al. (1998b): Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24): 14367-72.

Battistini B, D'Orleans-Juste P and Sirois P (1993): Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids. *Lab Invest* 68 (6): 600-28.

Belloni AS, Rossi GP, Andreis PG, et al. (1996): Endothelin adrenocortical secretagogue effect is mediated by the B receptor in rats. *Hypertension* 27 (5): 1153-9.

Black DL (2000): Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 103 (3): 367-70.

Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, et al. (1992): Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res* 70 (6): 1191-7.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

- Brown J, Reading SJ, Jones S, et al. (2000): Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell line T24/83. *Lab Invest* 80 (1): 37-45.
- Burrell KM, Molenaar P, Dawson PJ, et al. (2000): Contractile and arrhythmic effects of endothelin receptor agonists in human heart in vitro: blockade with SB 209670. *J Pharmacol Exp Ther* 292 (1): 449-59.
- Cacoub P, Dorent R, Maistre G, et al. (1993): Endothelin-1 in primary pulmonary hypertension and the Eisenmenger syndrome. *Am J Cardiol* 71 (5): 448-50.
- Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, et al. (2001): Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358 (9288): 1119-23.
- Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, et al. (2004): Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43 (12 Suppl S): 62S-67S.
- Chen Z, Fisher RJ, Riggs CW, et al. (1997): Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 57 (10): 2013-9.
- Cho JY, Akbarali Y, Zerbini LF, et al. (2004): Isoforms of the Ets transcription factor NERF/ELF-2 physically interact with AML1 and mediate opposing effects on AML1-mediated transcription of the B cell-specific blk gene. *J Biol Chem* 279 (19): 19512-22.
- Clozel M, Breu V, Burri K, et al. (1993): Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* 365 (6448): 759-61.
- Conte MS, Bandyk DF, Clowes AW, et al. (2006): Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg* 43 (4): 742-751; discussion 751.
- Daull P, Benrezzak O, Arsenault D, et al. (2005): Triple vasopeptidase inhibition normalizes blood pressure in conscious, unrestrained, and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 18 (12 Pt 1): 1606-13.
- Davenport AP, O'Reilly G and Kuc RE (1995): Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type. *Br J Pharmacol* 114 (6): 1110-6.
- Dekker LV and Parker PJ (1994): Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 19 (2): 73-7.
- Denault JB, Claing A, D'Orleans-Juste P, et al. (1995): Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett* 362 (3): 276-80.
- Ding SS, Qiu C, Hess P, et al. (2003): Chronic endothelin receptor blockade prevents both early hyperfiltration and late overt diabetic nephropathy in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 42 (1): 48-54.
- Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, et al. (1994a): A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. Protective effects of the novel nonpeptide endothelin receptor antagonist SB 209670. *Circ Res* 75 (1): 190-7.
- Douglas SA, Meek TD and Ohlstein EH (1994b): Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol Sci* 15 (9): 313-6.
- Douglas SA and Ohlstein EH (1993): Endothelin-1 promotes neointima formation after balloon angioplasty in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8: S371-3.
- Eguchi S, Hirata Y, Imai T, et al. (1995): Endothelin-1 as an autocrine growth factor for endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3: S279-83.

- Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G, et al. (2001): Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligonucleotide gene therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 (4): 714-22.
- Elijovich F, Laffer CL, Amador E, et al. (2001): Regulation of plasma endothelin by salt in salt-sensitive hypertension. *Circulation* 103 (2): 263-8.
- Emoto N, Nurhantari Y, Alimsardjono H, et al. (1999): Constitutive lysosomal targeting and degradation of bovine endothelin-converting enzyme-1a mediated by novel signals in its alternatively spliced cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 274 (3): 1509-18.
- Emoto N and Yanagisawa M (1995): Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270 (25): 15262-8.
- Ezra D, Goldstein RE, Czaja JF, et al. (1989): Lethal ischemia due to intracoronary endothelin in pigs. *Am J Physiol* 257 (1 Pt 2): H339-43.
- Firth JD and Ratcliffe PJ (1992): Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 90 (3): 1023-31.
- Fisher RJ, Koizumi S, Kondoh A, et al. (1992): Human ETS1 oncoprotein. Purification, isoforms, -SH modification, and DNA sequence-specific binding. *J Biol Chem* 267 (25): 17957-65.
- Funke-Kaiser H, Bolbrinker J, Theis S, et al. (2000): Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1). *FEBS Lett* 466 (2-3): 310-6.
- Funke-Kaiser H, Lemmer J, Langsdorff CV, et al. (2003): Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) is a downstream target of the homeobox transcription factor Nkx2-5. *Faseb J* 17 (11): 1487-9.
- Funke-Kaiser H, Orzechowski HD, Richter M, et al. (1998): Human endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA expression is regulated by an alternative promoter. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 Suppl 1: S7-9.
- Galie N, Manes A and Branzi A (2004): The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 61 (2): 227-37.
- Giangrande PH, Zhang J, Tanner A, et al. (2007): Distinct roles of E2F proteins in vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (32): 12988-93.
- Giannessi D, Del Ry S and Vitale RL (2001): The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacol Res* 43 (2): 111.
- Goldstrohm AC, Greenleaf AL and Garcia-Blanco MA (2001): Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene* 277 (1-2): 31-47.
- Grimshaw MJ (2005): Endothelins in breast tumour cell invasion. *Cancer Lett* 222 (2): 129-38.
- Gutkind JS (2000): Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* 2000 (40): RE1.
- Haller H, Schaberg T, Lindschau C, et al. (1991): Endothelin increases [Ca²⁺]_i, protein phosphorylation, and O₂⁻ production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 261 (6 Pt 1): L478-84.
- Harland SP, Kuc RE, Pickard JD, et al. (1998): Expression of endothelin(A) receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. *Neurosurgery* 43 (4): 890-8; discussion 898-9.
- Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, et al. (1995): Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (14): 6344-8.

- Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, et al. (1998): Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS Lett* 428 (3): 304-8.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, et al. (1985): Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248 (5 Pt 1): C550-6.
- Higuchi R, Krummel B and Saiki RK (1988): A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16 (15): 7351-67.
- Hirata Y, Emori T, Eguchi S, et al. (1993): Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91 (4): 1367-73.
- Hofer B, Thone-Reineke C, Bauer C, et al. (1997): The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35 (3): 175-89.
- Hori M, Sato K, Sakata K, et al. (1992): Receptor agonists induce myosin phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent contractions in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 261 (2): 506-12.
- Horio T, Kohno M, Murakawa K, et al. (1991): Increased plasma immunoreactive endothelin-1 concentration in hypercholesterolemic rats. *Atherosclerosis* 89 (2-3): 239-46.
- Hosoda K, Nakao K, Tamura N, et al. (1992): Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor. *J Biol Chem* 267 (26): 18797-804.
- Ihling C, Gobel HR, Lippoldt A, et al. (1996): Endothelin-1-like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J Pathol* 179 (3): 303-8.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. (1989): The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (8): 2863-7.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, et al. (1988a): Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 255 (4 Pt 2): H970-3.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, et al. (1988b): Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch* 413 (1): 108-10.
- Itoh Y, Yanagisawa M, Ohkubo S, et al. (1988): Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett* 231 (2): 440-4.
- Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, et al. (1996): Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 169 (3): 522-31.
- Jozsef L, Khreiss T, Fournier A, et al. (2002): Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol* 135 (5): 1167-74.
- Juvela S (2002): Plasma endothelin and big endothelin concentrations and serum endothelin-converting enzyme activity following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 97 (6): 1287-93.
- Kedzierski RM and Yanagisawa M (2001): Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 851-76.
- Kido H, Nakano A, Okishima N, et al. (1998): Human chymase, an enzyme forming novel bioactive 31-amino acid length endothelins. *Biol Chem* 379 (7): 885-91.

- Kikkawa K, Saito A, Iwasaki H, et al. (1999): Prevention of cerebral vasospasm by a novel endothelin receptor antagonist, TA-0201. *J Cardiovasc Pharmacol* 34 (5): 666-73.
- Kimes BW and Brandt BL (1976): Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 98 (2): 367-81.
- Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, et al. (1989): Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5: S5-7; discussion S18.
- Kirchengast M and Luz M (2005): Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions. *J Cardiovasc Pharmacol* 45 (2): 182-91.
- Koizumi S, Fisher RJ, Fujiwara S, et al. (1990): Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* 5 (5): 675-81.
- Korth P, Bohle RM, Corvol P, et al. (1999): Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 47 (4): 447-62.
- Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, et al. (1998): The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 338 (12): 784-90.
- Kwan AL, Lin CL, Chang CZ, et al. (2002): Oral administration of an inhibitor of endothelin-converting enzyme attenuates cerebral vasospasm following experimental subarachnoid haemorrhage in rabbits. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48: 414S-417S.
- La M and Reid JJ (1995): Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22 (5): 315-23.
- Lahav R (2005): Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol* 49 (2-3): 173-80.
- Leprince D, Gegonne A, Coll J, et al. (1983): A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306 (5941): 395-7.
- Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, et al. (1991): Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 325 (14): 997-1001.
- Li R, Pei H and Watson DK (2000a): Regulation of Ets function by protein - protein interactions. *Oncogene* 19 (55): 6514-23.
- Li R, Pei H, Watson DK, et al. (2000b): EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* 19 (6): 745-53.
- Lorenzo MN, Khan RY, Wang Y, et al. (2001): Human endothelin converting enzyme-2 (ECE2): characterization of mRNA species and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta* 1522 (1): 46-52.
- Luscher TF and Barton M (2000): Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102 (19): 2434-40.
- Martin-Nizard F, Houssaini HS, Lestavel-Delattre S, et al. (1991): Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin. *FEBS Lett* 293 (1-2): 127-30.
- Mascia L, Fedorko L, Stewart DJ, et al. (2001): Temporal relationship between endothelin-1 concentrations and cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 32 (5): 1185-90.
- Matsumoto H, Suzuki N, Onda H, et al. (1989): Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 164 (1): 74-80.

Matsumura Y, Tsukahara Y, Kojima T, et al. (1995): Effects of phosphoramidon on endothelin-1 and big endothelin-1 production in human aortic endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 18 (3): 401-6.

Matsuura A, Kawashima S, Yamochi W, et al. (1997): Vascular endothelial growth factor increases endothelin-converting enzyme expression in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235 (3): 713-6.

Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, et al. (1997): Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation* 95 (1): 221-30.

Molenaar P, O'Reilly G, Sharkey A, et al. (1993): Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium. *Circ Res* 72 (3): 526-38.

Montanari A, Biggi A, Carra N, et al. (2003): Endothelin-A receptors mediate renal hemodynamic effects of exogenous Angiotensin II in humans. *Hypertension* 42 (4): 825-30.

Ogata K, Sato K and Tahirov TH (2003): Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin Struct Biol* 13 (1): 40-8.

Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, et al. (1992): The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol* 225 (4): 347-50.

Ohwaki T, Sakai H and Hirata Y (1994): Partial characterization of endothelin-converting enzyme activity in human serum lipoproteins. *Atherosclerosis* 108 (2): 175-81.

Okada M, Nishino M, Saito M, et al. (2000): Marked reduction of mortality in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats by the new, selective endothelin ETA receptor antagonist, J-105859. *J Hypertens* 18 (12): 1815-23.

Opgenorth TJ, Wu-Wong JR and Shiosaki K (1992): Endothelin-converting enzymes +++. *Faseb J* 6 (9): 2653-9.

Orth SR, Viedt C, Amann K, et al. (2001): Endothelin in renal diseases and cardiovascular remodeling in renal failure. *Intern Med* 40 (4): 285-91.

Orzechowski HD, Gunther A, Menzel S, et al. (2001): Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol Pharmacol* 60 (6): 1332-42.

Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, et al. (1997): Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *J Mol Med* 75 (7): 512-21.

Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, et al. (1999): Cloning and functional characterization of the bovine endothelin-converting enzyme-1a promoter. *Biochim Biophys Acta* 1446 (3): 352-8.

Pollock DM (2000): Renal endothelin in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9 (2): 157-64.

Pollock DM (2005): Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension. *Hypertension* 45 (4): 477-80.

Pollock DM, Keith TL and Highsmith RF (1995): Endothelin receptors and calcium signaling. *Faseb J* 9 (12): 1196-204.

Pufall MA and Graves BJ (2002a): Autoinhibitory domains: modular effectors of cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 421-62.

Pufall MA and Graves BJ (2002b): Ets-1 flips for new partner Pax-5. *Structure* 10 (1): 11-4.

- Remuzzi G, Perico N and Benigni A (2002): New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov* 1 (12): 986-1001.
- Rieber AJ, Marr HS, Comer MB, et al. (1993): Extent of differentiated gene expression in the human endothelium-derived EA.hy926 cell line. *Thromb Haemost* 69 (5): 476-80.
- Riggleman A, Harvey J and Baylis C (2001): Endothelin mediates some of the renal actions of acutely administered angiotensin II. *Hypertension* 38 (1): 105-9.
- Rothermund L, Luckert S, Kossmehl P, et al. (2001): Renal endothelin ET(A)/ET(B) receptor imbalance differentiates salt-sensitive from salt-resistant spontaneous hypertension. *Hypertension* 37 (2): 275-80.
- Rubanyi GM and Polokoff MA (1994): Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46 (3): 325-415.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. (2002): Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346 (12): 896-903.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, et al. (1990): Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348 (6303): 732-5.
- Sato Y (2001a): Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26 (1): 19-24.
- Sato Y, Teruyama K, Nakano T, et al. (2001b): Role of transcription factors in angiogenesis: Ets-1 promotes angiogenesis as well as endothelial apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 947: 117-23.
- Schmidt M, Kroger B, Jacob E, et al. (1994): Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* 356 (2-3): 238-43.
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, et al. (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17 (15): 6419.
- Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, et al. (1997): Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 328 (Pt 3): 871-7.
- Seccia TM, Belloni AS, Kreutz R, et al. (2003): Cardiac fibrosis occurs early and involves endothelin and AT-1 receptors in hypertension due to endogenous angiotensin II. *J Am Coll Cardiol* 41 (4): 666-73.
- Sharrocks AD (2001): The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (11): 827-37.
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, et al. (1997): The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (12): 1371-87.
- Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, et al. (1995): Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett* 371 (2): 140-4.
- Shimada K, Takahashi M and Tanzawa K (1994): Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* 269 (28): 18275-8.
- Shimada K, Takahashi M, Turner AJ, et al. (1996): Rat endothelin-converting enzyme-1 forms a dimer through Cys412 with a similar catalytic mechanism and a distinct substrate binding mechanism compared with neutral endopeptidase-24.11. *Biochem J* 315 (Pt 3): 863-7.
- Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, et al. (2000): Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res* 259 (1): 213-24.

- Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, et al. (1991): Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114 (6): 464-9.
- Suzuki K, Meguro K, Sakurai T, et al. (2000): Endothelin-1 concentration increases in the cerebrospinal fluid in cerebral vasospasm caused by subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol* 53 (2): 131-5.
- Takahashi K, Sawasaki Y, Hata J, et al. (1990): Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 26 (3 Pt 1): 265-74.
- Takahashi M, Fukuda K, Shimada K, et al. (1995): Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells. *Biochem J* 311 (Pt 2): 657-65.
- Tanaka K, Oda N, Iwasaka C, et al. (1998): Induction of Ets-1 in endothelial cells during reendothelialization after denuding injury. *J Cell Physiol* 176 (2): 235-44.
- Tilghman SM, Tiemeier DC, Seidman JG, et al. (1978): Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse beta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (2): 725-9.
- Trachtenberg JD, Sun S, Choi ET, et al. (1993): Effect of endothelin-1 infusion on the development of intimal hyperplasia after balloon catheter injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 8: S355-9.
- Tsujino M, Hirata Y, Eguchi S, et al. (1995): Nonselective ETA/ETB receptor antagonist blocks proliferation of rat vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty. *Life Sci* 56 (25): PL449-54.
- Turner AJ and Murphy LJ (1996): Molecular pharmacology of endothelin converting enzymes. *Biochem Pharmacol* 51 (2): 91.
- Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, et al. (1999): A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 264 (2): 341-9.
- Valdenaire O, Rohrbacher E, Langeveld A, et al. (2000): Organization and chromosomal localization of the human ECEL1 (XCE) gene encoding a zinc metallopeptidase involved in the nervous control of respiration. *Biochem J* 346 Pt 3: 611-6.
- Valdenaire O, Rohrbacher E and Mattei MG (1995): Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 270 (50): 29794-8.
- Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, et al. (1989): Complementary patterns of expression of c-ets 1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 107 (2): 265-74.
- Wanebo JE, Arthur AS, Louis HG, et al. (1998): Systemic administration of the endothelin-A receptor antagonist TBC 11251 attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: dose study and review of endothelin-based therapies in the literature on cerebral vasospasm. *Neurosurgery* 43 (6): 1409-17; discussion 1417-8.
- Wang X, Douglas SA, Loudon C, et al. (1996): Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat. *Circ Res* 78 (2): 322-8.
- Wasylyk B, Hagman J and Gutierrez-Hartmann A (1998): Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 23 (6): 213-6.
- Wasylyk B, Hahn SL and Giovane A (1993): The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211 (1-2): 7-18.
- Wasylyk C, Schlumberger SE, Criqui-Filipe P, et al. (2002): Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 22 (8): 2687-702.

Werner T (1999): Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm Genome* 10 (2): 168-75.

Wernert N, Raes MB, Lassalle P, et al. (1992): c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *Am J Pathol* 140 (1): 119-27.

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, et al. (1991): The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 10 (3): 233-8.

Xu D, Emoto N, Giaid A, et al. (1994): ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 78 (3): 473-85.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. (1988): A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332 (6163): 411-5.

Yang LL, Arab S, Liu P, et al. (2005): The role of endothelin-1 in myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: old lessons and new insights. *Can J Physiol Pharmacol* 83 (1): 47-62.

Yordy JS and Muise-Helmericks RC (2000): Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene* 19 (55): 6503-13.

Zeicher AM, Goebel H, Schachinger V, et al. (1995): Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina. *Circulation* 91 (4): 941-7.

Zhu W, Zou Y, Shiojima I, et al. (2000): Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275 (20): 15239-45.

8.2 Materialien

8.2.1 Oligonukleotide für Gelshifts (EMSA)

Alle Antisense-Oligonukleotide sind revers komplementär dargestellt.

humane Sequenzen

Oligonukleotide	Sequenz
c-Ets-1	Sense : gtcagttaagcaGGAAGtgactaac Antisense: gttagtcaCTTCCTgcttaactgac
Ets-negativ	Sense : ggcggccccgccctccggc Antisense: gccggagggcggggcccgc
h-226	Sense : aaagaacaGGATgtttggac Antisense: gtccaaacATCCTgttcttt
h-347	Sense : tgagctaaGGATgtctgtgc Antisense: gcacagacATCCTtagctca
h-639	Sense : gctaaacaGGAAGggaggca Antisense: tgctcccTTCCTgtttagc
h-659	Sense : caatgagaGGAAGtgaggc Antisense: ccctgcacTTCCTctcattg
h-787	Sense : gttttgcaGGAAGcatctct Antisense: agagatgcTTCCTgcaaac
h-816	Sense : acaagacaGGAAGggtctcc Antisense: ggagaccTTCCTgtcttgt
h-972	Sense : ccgttccaGGAAGccctccc Antisense: gggagggcTTCCTggaacgg

bovine Sequenzen

Oligonukleotide	Sequenz
b-211	Sense : aaagaacaGGATgtttgcac Antisense: gtgcaaacATCCTgttcttt
b-602	Sense : gctaaacaGGAAGcaggta Antisense: tacctcgtTTCCTgtttagc
b-622	Sense : caatgagaGGAAGtgaggc Antisense: ccctccacTTCCTctcattg

8.2.2 Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung
4xProbenpuffer (nach Laemmli)	250 mM Tris-Base (121,14 g/mol) 40 % Glycerol 8 % SDS 20 % β -Mercapto-Ethanol 0,006 % Bromphenolblau

5xBindungspuffer	100 mM HEPES-KOH 15 mM KCL
5xTris-Glycin	250 mM Tris-Base 2 M Glycin 0,5 M Na ₂ EDTA
10xTBE	0,9 M Tris-Base (121,14 g/mol) 0,9 M Borsäure 0,5 M Na ₂ EDTA
10xTBS (pH 7,5)	200 mM Tris-Base (121,14 g/mol) 1,5 M NaCl
Elektrophoresepuffer (nach Laemmli)	25 mM Tris-Base (121,14 g/mol) 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Formaldehyd / Glutaraldehyd	540 µl Formaldehyd (37%) 80 µl Glutaraldehyd (25%) ad 10 ml 1xPBS (pH 7,4)
Gelbeladungspuffer (Gelshift)	50 % Glycerol 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol
Gelbeladungspuffer (TBE-Gele)	15 % Ficoll 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol
Homogenisationspuffer (Gesamtprotein)	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 5 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA + Complete™ (auf 10 ml Puffer 1 Tbl. Complete-Mini)
Hypotoner Homogenisationspuffer (P1)	10 mM Hepes-KOH (pH 7,9) 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA + Complete™
Hypertoner Kernextraktionspuffer (P2)	20 mM Hepes-KOH (pH 7,9) 25 % Glycerin 400 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA + Complete™
LB-Medium (pH 7,05)	10 g Bacto-Tryptane 5 g Bacto-Yeast Extract 10 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O - 30 ' Autoklavieren

LB-Platten	100 ml LB-Medium 1,5 g Bacto-Agar - 30 ' Autoklavieren 30 µg/ml Ampicillin - Platten gießen - Lagerung bei 4°C
Membranproteinextraktionspuffer (P3)	20 mM Tris (pH 7,5) 250 mM Sucrose + Complete™
TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-Base (121,14 g/mol) 1 mM EDTA
Transferpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris-Base (121,14 g/mol) 150 mM Glycin 10 % Methanol

8.2.3 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Katalognummer
$\gamma^{32}\text{P}$ - ATP	Amersham Life Science Buchler GmbH, Braunschweig	AA 0068
Agarose	Appligene oncor, Illkirch, Frankreich	130022
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	A-9164
Bromophenolblau Natriumsalz	Merck, Darmstadt	11746
Chloroform	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	C5312
Complete™, Mini, EDTA-frei (Proteinaseinhibitor-Cocktail)	Boehringer, Mannheim	1836 170
Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	D-5758
EDTA	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	E-5134
EGTA	Merck, Darmstadt	8435
Essigsäure	Merck, Darmstadt	1.00063
Ethanol	Roth GmbH, Karlsruhe	9065.2
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt	11615
Ficoll ^R 400	Pharmacia Biotech, München	17-0400-01
Formaldehyd 37%	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	F-1635
Formamid	Roth GmbH, Karlsruhe	6749.1
Glycerol	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	G-5516
Glycin	Merck, Darmstadt	1.04201
Hepes	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	H-3375
IGEPAL CA - 630	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	I-3021
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt	818969
Isopropanol	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	I-9516

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt	1.04936.1000
Kaliumhydroxid (KOH) Plättchen	Merck, Darmstadt	5033.1000
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Eggenstein	Y 02016
Mercapto-Ethanol	Merck, Darmstadt	15433
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Holland	8045
Natriumacetate	Merck, Darmstadt	1.06268
Natriumcitrat Dihydrat	Roth GmbH, Karlsruhe	3580.2
Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH, Karlsruhe	3957.2
Natriumhydroxid (NaOH) Plättchen	Merck, Darmstadt	6495
dNTP	Pharmacia Biotech, München	27-2035-02
N,N'Methylene-Bisacrylamide 2X	Serva GmbH, Heidelberg	29195
Phenol	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	P-4682
poly d(AT) DNA	Boehringer Mannheim	108740
poly d(IC) DNA	Boehringer Mannheim	108812
Polyacrylamide 4X	Serva GmbH, Heidelberg	10678
Taq-Polymerase 10 X Puffer	GibcoBRL Life Technologies GmbH, Eggenstein	Y 02028
T4 Polynukleotidkinase 10 X Puffer	Biolabs, New England	201 S
Ponceau S	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	P-7767
SDS (Sodium-dodecyl-sulfat)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	161-0302
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	T-9281
Tris-Base Tris(hydroxymethyl)aminoethan	Merck, Darmstadt	1.08382
Triton X 100	Merck, Darmstadt	11869.
Tryptone	Boehringer Mannheim	0123-17-3
X-Gal	Carl Roth, Karlsruhe	2315.3
Xylencyanol	Merck, Darmstadt	10590

8.2.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Ets-1 Antikörper C-20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	sc-350 X
ETS-Antiserum	Freundlicherweise von J. Hagman zur Verfügung gestellt	-
normal rabbit-IgG	Santa Cruz GmbH, Eggenstein	sc-2027

8.2.5 Vektoren

Name	Hersteller	Katalognummer
pGEM-T Easy	Promega, Mannheim	A1360
pGL3-Basic	Promega, Mannheim	E1751
pCR3.1	Invitrogen, Karlsruhe	K3000-01

8.2.6 Zellen und Zellkultur

Prokaryote Zellen	Hersteller	Katalognummer
E. coli DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe	18265-017

Eukaryote Zellen	Medienzusammensetzung
EA.hy926-Zellen	DMEM + 4,5 g/l Glucose + L-Glutamin (500 ml) + 55 ml FCS (10 %) + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 X) + 5ml Natrium Pyruvat (100 mM) + 5ml NEAA (100 X) + 10 ml HAT-Supplement
BAEC	DMEM + 4,5 g/l Glucose + L-Glutamin (500 ml) + 55 ml FCS (10 %) + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 X) + 5ml Natrium Pyruvat (100mM) + 5ml NEAA (100 X)
CHO-K1	HAM's F12 + 50 ml FCS (10%) + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 X)
ECV304	Medium 199 + 50 ml FCS (10 %) + 5ml L-Glutamin + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 X)
HMEC-1	Endothel-Basal-Medium + 25 ml FCS (5 %) + 1,0 ml Hydrocortison (0,05 mM) + 50 μ l EGF (100 μ g/ml) + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 X)
H9c2	DMEM + 1g/l Glucose + L-Glutamin (500 ml) + 50 ml FCS (10 %) + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 X) + 5ml Natrium Pyruvat (100 mM) + 5ml NEAA (100 X)

Kulturmedien

Kulturmedien und Zusätze	Hersteller	Katalognummer
Ampicillin Natriumsalz	Roth GmbH, Karlsruhe	K029.1
Bacto-Agar 454g	DIFCO Laboratories, Detroit, MI	0140-01
Bacto Tryptone 500g	DIFCO Laboratories, Detroit, MI	0123-17-3
Bacto Yeast Extract 500g	DIFCO Laboratories, Detroit, MI	0127-17-9
Collagen A	Biochrom KG, Berlin	L 7220
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA	D-8418
Doxicyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	D 9891
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM – 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine)	Biochrom KG, Berlin	F 0435
Endothel-Basal-Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe	PAA U15-011
Endothelial Cell Basal Medium	Promo Cell, Heidelberg	L 11-004
Endothelial Cell Growth Medium	Promo Cell, Heidelberg	C 22-010
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin	S 0115
Geneticin 50mg/ml	GibcoBRL, Gaithersburg, MD	10131-019
HAM's F12	Biochrom KG, Berlin	FG 815
HAT-Supplement	Biochrom KG, Berlin	F 0483
HT-Supplement	Biochrom KG, Berlin	F 0493
Medium 199	Biochrom KG, Berlin	
NEAA (Nicht-essentielle Aminosäuren)	Biochrom KG, Berlin	13-114 E
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 500 ml	Biochrom KG, Berlin	L 1825
Penicillin und Streptomycin	Bio Whittaker	17-602E
Staurosporin	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	S-4400
TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate)	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	P-1585
Trypsin-Versene 100 ml	Bio Whittaker	17-161E

8.2.7 Kits

Name	Hersteller	Katalognummer
100 bp DNA Ladder 50 µg	GibcoBRL, Gaithersburg, MD	15628-019
1 kb DNA Ladder 250 µg	GibcoBRL, Gaithersburg, MD	15615-016
4 dNTPs; je 40 µmol	Promega Corporation, Madison, WI	U1240
DC™ Protein Assay	BioRad, USA	500-0002
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega, Mannheim	E1910
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden	203443
Luciferase Assay System 10-pack	Promega GmbH, Mannheim	E1501
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen, Hilden	12163
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden	12144
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen, Hilden	27106
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	28106
Sensiscript RT Kit Qiagen	Qiagen, Hilden	205211

8.2.8 Labormaterial

Material	Hersteller	Katalog-Nummer
12-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden	150628
Blotting Papier Whatman 3 MM	Boehringer, Mannheim	4926.1
Dual adjustable slab Gel System	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	E 1018
Falcon-Röhrchen 50 ml	Nunc, Wiesbaden	73687
Falcon-Röhrchen 15 ml	Nunc, Wiesbaden	374632
Gelshift Glasplatten	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	G-0901
Gelshift Kamm	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	C-4300
Gelshift Spacer	Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA	S-5399
Hybond™ N Membran	Amersham Life Science Buchler, Braunschweig	RPN 303N
Hybond™ N+ Membran	Amersham Life Science Buchler, Braunschweig	RPN 303B
Kulturflaschen mit Filter (75cm ²)	Nunc, Wiesbaden	156472
MicroSpin G25 Columns	Amersham Life Science Buchler, Braunschweig	27-5325-01
Pasteurpipetten aus Glas, ca. 225 mm	Brand GmbH + Co, Wertheim	7477 20
Pipette Eppendorf Reference variabel (10 µl, 100 µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg	4910 000.018 4910 000.042 4910 000.069
Plastikpetrischalen Greiner	Bio-one, Frickenhausen	633102
Phosphoimager Platte	Fuji Photo Film Co., LTD., Japan	BAS-MP 2040S

Reaktionsgefäße mit Verschluss (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg	0030 121.147 0030 120.159 0030 120.094
Reaktionsgefäße mit Drehverschluß	Sarstedt, Nümbrecht	72692005
Röntgenfilme Kodak X-OMAT	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	F-5513
Sephadex G-25 Quick Spin™ Columns	Boehringer, Mannheim	1 273 922
Sephadex G-50 Quick Spin™ Columns	Boehringer, Mannheim	1 273 949
Sterile Filterpipetten-Aufsätze	Nunc, Wiesbaden	2065E
UltraTube 16x76 mm	Nalgene, Rochester, NY	3425-1613
Zellschaber (23 cm)	Nunc GmbH, Wiesbaden	179 693

8.2.9 Geräte

Geräte	Hersteller
ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
Begasungsbrutschrank Baureihe 6000	Heraeus Instruments GmbH, Berlin
Centrifuge 5402	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Centrifuge 5415	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Certomat (Schüttelinkubator)	Braun, Melsungen
Geldokumentationssystem 5000	Renner, Dannstadt
L-70 Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Liquid Scintillation Counter 1219	RackbetaLKB Wallac, Turku, Finnland
Lumat LB 9501 Luminometer	Berthold, Wildbad
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg
MRX Microplate Reader	Dynex Technologies, Dentendorf
Phosphorimager BAS-1500	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Berlin
Photometer UV-1202	Shimadzu, Duisburg
PTC-100 Programmable Thermal Controller	MJ Research, Inc., Watertown, Mass., USA
Sorvall Superspeed RC2-B Centrifuge	DuPont de Nemours GmbH, Bad Homburg
Revelation Program 3.0	Dynex Tech., Denkendorf
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen
Spannungsquelle Feather Volt™ 2000	Stratagene GmbH, Heidelberg
Speed Vac Concentrator	Bachhofer, Reutlingen
Spektrometer UV-VIS 1202	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg
Sicherheitsbank	Gelaire Flow Lab., Opera, Italien
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
UV Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg

8.3 CURRICULUM VITAE

Andreas Zimmermann

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

8.4 Publikationen

8.4.1 Originalarbeiten (Peer-reviewed)

Orzechowski HD, Gunther A, Menzel S, **Zimmermann A**, Funke-Kaiser H, Zollmann FS, Paul M (2001): Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Mol Pharmacol* 60: 1332-42.

Funke-Kaiser H, Thomas A, Bremer J, Kovacevic SD, Scheuch K, Bolbrinker J, Theis S, Lemmer J, **Zimmermann A**, Zollmann FS, Herrmann SM, Paul M, Orzechowski HD (2003): Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites. *J Hypertens* 21: 2111-24.

8.4.2 Publierte Abstracts/Kongressbeiträge

Orzechowski HD, **Zimmermann A**, Günther A, Funke-Kaiser H, Paul M (2002): Transcriptional and signaling mechanisms of isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting-enzyme (ECE)-1 in human endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R8. 43. Frühjahrstreffen der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz 12.-14.03.2002.

Orzechowski HD, **Zimmermann A**, Paul M (2004): Functional analysis of the endothelin-converting enzyme (ECE)-1a isoform-specific promoter reveals regulation by transcriptional repression. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (Suppl.1): 32. 45. Frühjahrstreffen der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz 09.-11.03.2004.

8.4.3 Kongressbeiträge

Zimmermann A, Paul M, Orzechowski HD (2003): Functional analysis of the ECE-1a isoform-specific promoter reveals regulation by transcriptional repression. 8th Annual Meeting of the European Council of Vascular Research (ECCR), Seeheim bei Frankfurt a.M., 10.-12.10.2003.

Orzechowski HD, **Zimmermann A**, Paul M (2005): Functional analysis of the endothelin-converting enzyme (ECE)-1a isoform-specific promoter reveals regulation by transcriptional repression. 9th International Conference on Endothelin, Park City, Utah, USA, 11.-14.09.2005.

8.5 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Andreas Zimmermann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Mechanismen der Regulation des ECE-1a-Promotors durch ETS-Transkriptionsfaktoren in kultivierten Endothelzellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift