

## 4 Ergebnisse

Ziel der Versuche war es, die Koexpression – als Voraussetzung für eine mögliche Interaktion – des Transkriptionsfaktors Nkx-2.5 und des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms-1, bzw. seiner Isoformen (hier untersucht wurden die Isoformen a, b und c) in H9c2-Kardiomyoblasten mittels RT-PCR, RPA und Western Blot-Analyse zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Expression in Herzanlagen von Rattenembryonen sowie in humanen Herzgewebeproben von Patienten mit angeborenen, konotrunkalen Herzfehlern untersucht.

In einem zweiten Schritt wurde dann in in-vitro-Experimenten die mögliche Interaktion zwischen Nkx2.5 und den regulatorischen Bereichen des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms-1 untersucht.

### 4.1 Ergebnisse der RT/PCR

Zunächst wurde die Expression von Nkx2.5 und den verschiedenen ECE-1-Isoformen (a, b und c) auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Ziel war hier nicht eine quantitative Analyse, sondern lediglich eine qualitative Aussage im Sinne einer Ja-Nein-Antwort, da aufgrund der geringen Materialmengen – v.a. bei den humanen Gewebeproben – eine mehrfache Reproduktion im Sinne einer quantitativen Analyse nicht möglich war.

#### 4.1.1 RT/PCR mit cDNA von H9c2-Zellen als Matrize

Mittels der RT/PCR-Analyse von Rattenkardiomyoblasten (H9c2-Zellen) konnte erstmals eine Koexpression von Nkx2.5 und den ECE-Isoformen a, b und c gezeigt werden (Abb.4.1).

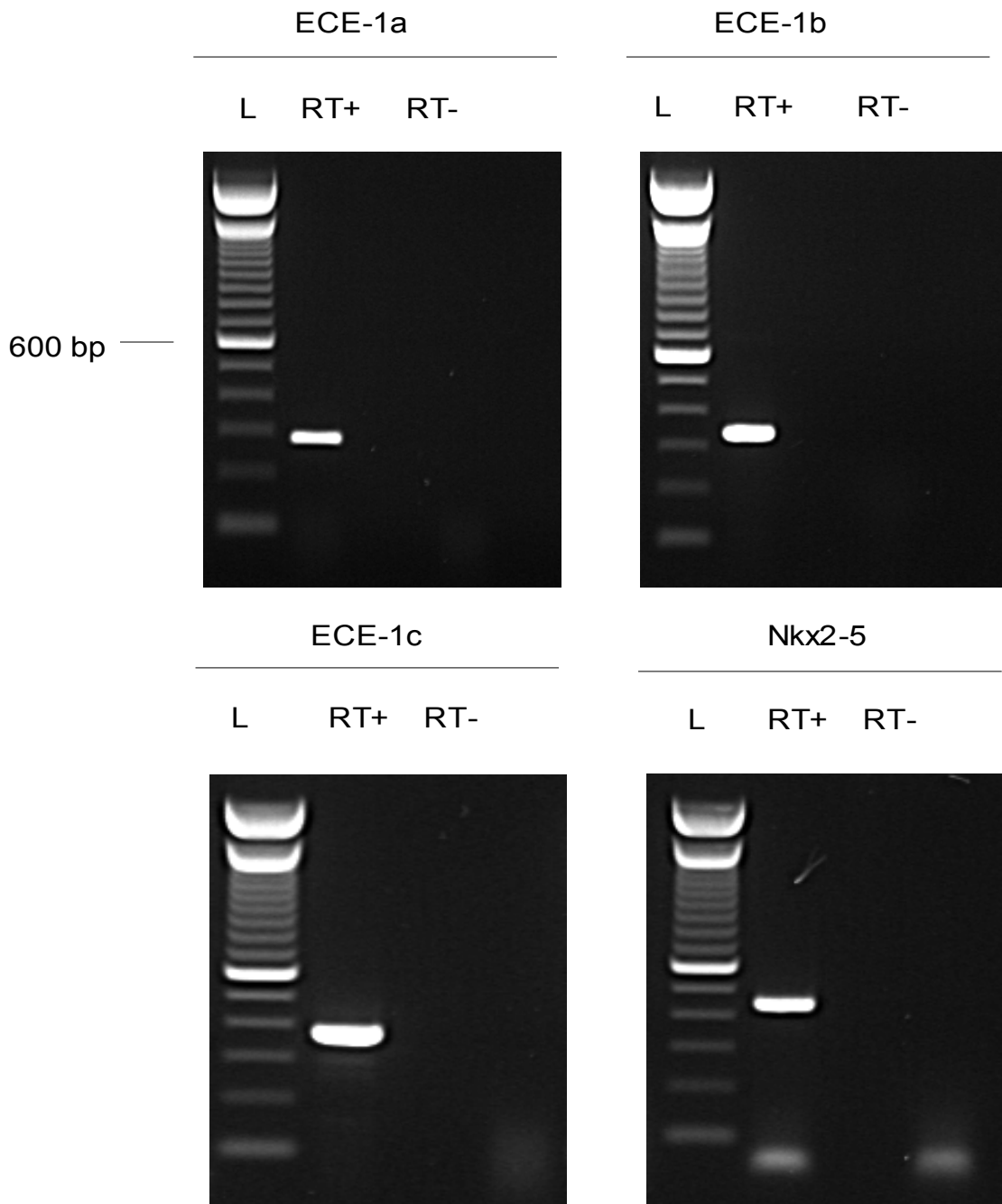


Abb. 4.1: Koexpression von ECE-1a, -1b, -1c und Nkx2.5 in H9c2-Zellen auf mRNA-Ebene; Nachweis mittels RT/PCR

RT+ = mit reverser Transkriptase, RT- = ohne reverse Transkriptase als Kontrolle

Alle drei Isoformen und der Transkriptionsfaktor Nkx2.5 werden auf mRNA-Ebene exprimiert. Zum Ausschluß genomischer Verunreinigungen wurden jeweils „RT-Minus“-Reaktionen, d.h. ohne reverse Transkriptase, mitgeführt.

#### 4.1.2 RT/PCR mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize

Die Ergebnisse der RT/PCR Untersuchungen auf den embryonalen Herzanlagen von Ratten sind in der Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Da aus den oben genannten Gründen eine mehrfache Reproduktion und eine quantitative Analyse nicht möglich waren, ist in der Tab. 4.1. lediglich angegeben, ob eine Expression nachzuweisen war, und eine Einschätzung der Expression in bezug auf GAPDH vorgenommen.

Tab. 4.1. Rattenherzanlagen Embryonaltag 10 bis 13 in vivo

Versuch-Nr.	Embryonaltag	ECE-1a	ECE-1b	ECE-1c	Nkx-2.5	GAPDH
K015-99	10,0 in vivo	++	++	++	++	++
K026-99	10,5 in vivo	++	++	++	++	++
K016-99	11,0 in vivo	++	++	++	+	++
K032-99	11,5 in vivo	++	++	++	++	++
K033-99	12,0 in vivo	++	++	++	+	++
K034-99	12,5 in vivo	++	++	++	++	+++
K027-99	13,0 in vivo	++	++	++	++	+++

+ = schwaches Signal; ++ = mittelstarkes Signal; +++ = starkes Signal

Die Ergebnisse der PCR-Analyse sind in den Abbildungen 4.2.-4.6. dargestellt.

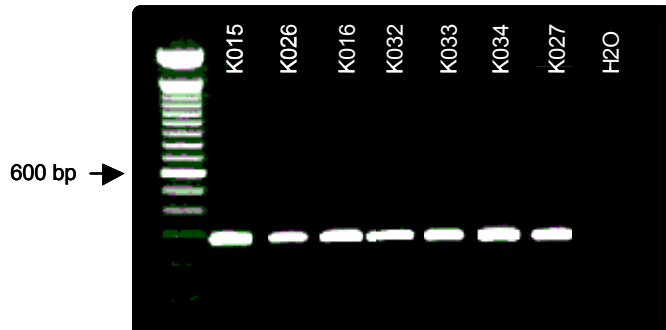


Abb. 4.2: ECE-1a mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize, Tag 10-13 p.c.  
(K015 – Tag 10; K026 – Tag 10.5; K016 – Tag 11; K032 – Tag 11.5; K033 – Tag 12;  
K034 – Tag 12.5; K027 – Tag 13)

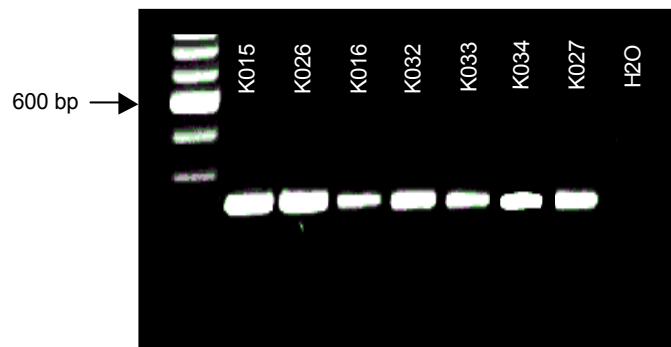


Abb. 4.3: ECE-1b mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize, Tag 10-13 p.c.  
(K015 – Tag 10; K026 – Tag 10.5; K016 – Tag 11; K032 – Tag 11.5; K033 – Tag 12;  
K034 – Tag 12.5; K027 – Tag 13)

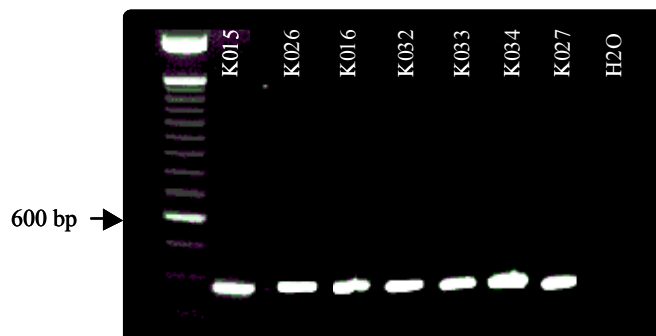


Abb. 4.4: ECE-1c mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize, Tag 10-13 p.c.  
(K015 – Tag 10; K026 – Tag 10.5; K016 – Tag 11; K032 – Tag 11.5; K033 – Tag 12;  
K034 – Tag 12.5; K027 – Tag 13)

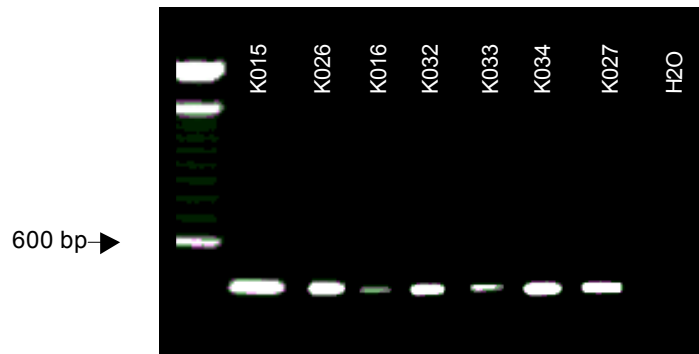


Abb. 4.5: Nkx2.5 mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize, Tag 10-13 p.c.  
(K015 – Tag 10; K026 – Tag 10.5; K016 – Tag 11; K032 – Tag 11.5; K033 – Tag 12;  
K034 – Tag 12.5; K027 – Tag 13)

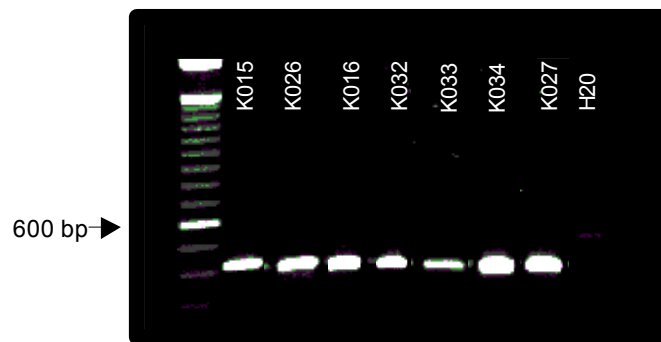


Abb. 4.6: GAPDH mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize, Tag 10-13 p.c.  
(K015 – Tag 10; K026 – Tag 10.5; K016 – Tag 11; K032 – Tag 11.5; K033 – Tag 12;  
K034 – Tag 12.5; K027 – Tag 13)

#### 4.1.3 RT-PCR mit cDNA von humanen Gewebeproben als Matrize

In allen humanen Gewebeproben von Patienten mit angeborenen Herzfehlern konnte in der vorgelegten Untersuchung die Expression des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 sowie der drei Isoformen des ECE-1 (ECE-1a, ECE-1b und ECE-1c) auf mRNA-Ebene mittels RT/PCR nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde die Expression dieser Gene in fetalem und adultem Herzen mittels RT-PCR auf humaner Poly-A<sup>+</sup>-RNA untersucht. Auch hier gelang es, die Expression aller Isoformen und des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 nachzuweisen. Entsprechend der Auswertung bei den Rattenherzanlagen wurden auch hier die Banden im Sinne einer Standardisierung im Vergleich zu

GAPDH bewertet. Die Methode erlaubt jedoch keine genauen quantitativen Aussagen, sondern nur qualitative. Die Beurteilung bezieht sich daher hauptsächlich auf die Aussage „wird exprimiert“/“wird nicht exprimiert“.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefaßt, wobei die Patienten in aufsteigendem Alter zum Zeitpunkt der OP aufgelistet sind.

Tab.4.2. Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse aus den humanen Herzgewebeproben

Die in den Abbildungen 4.7-4.11 dargestellten PCR-Ergebnisse sind mit einem Sternchen (\*) markiert.

Pat.-Nr.	Gewebe	ECE-1a	ECE-1b	ECE-1c	Nkx-2.5	GAPDH
1	Vorhof	++	+	+++	+	+++
2a*	Vorhof	+(+)	+	+++	++	+++
2b*	Ventrikel	+(+)	+	+++	+	+++
3	Aortenisthmus?	++	+	+++	++	+++
4a	Ventrikel	keine RNA				
4b	Vorhof	+(+)	+	+++	+	+++
5a*	Ventrikel	++	+	+++	++	+++
5b*	Vorhof	++	+	+++	++	+++
6a	Ventrikel	+(+)	+	+++	(+)	+++
6b	Vorhof	++	+	+++	+	+++
7a*	Vorhofseptum	++	+	+++	+	+++
7b*	Ventrikel	++	+	+++	+	+++
7c*	Vorhof	++	+	+++	+	+++
8a	Ventrikel	keine RNA				
8b	Vorhof	++	+	+++	+	+++
9a	Ventrikel (Ausflußtrakt)	++	+	+++	+	+++
9b	Vorhof	+(+)		+++	+	

Pat.-Nr.	Gewebe	ECE-1a	ECE-1b	ECE-1c	Nkx-2.5	GAPDH
10a	Ventrikelendokard	keine RNA				
10b						
10c	Ventrikel		+	+++	++	+++
	Vorhof		+	+++	+	+++
11*	Ventrikel	++(+)	+	+++	++	+++
12a*	Ventrikel	+(+)	+	+++	++	+++
12b*	Vorhof	++		+++	++	+++
13a*	Ventrikel	+(+)	+	+++	++	+++
13b*	Vorhof	++	+	+++	++	+++
14a*	Ventrikel	++	+	+++	+	+++
14b*	Vorhof	++	+	+++	+	+++
15	Ventrikel	++	+	+++	+	+++
16	Ventrikel	++	+	+++	++	+++
17a*	Ventrikel	+(+)	+	+++	+	+++
17b*	Vorhof	++	+	+++	+	+++
18a	Ventrikel	+(+)	+	+++	+	+++
18b	Vorhof	++	+	+++	+	+++
19a*	Ventrikel	++	+	+++	++	+++
19b*	Vorhof	++	+	+++	++	+++
<b>adultes Herz*</b>		+++	+	+++	++	+++
<b>fetales Herz*</b>		+++	+	+++	++	+++

+ = schwaches Signal, ++ = mittelstarkes Signal, +++ = starkes Signal

Die Ergebnisse der mit \* markierten Proben sind in den folgenden Abb. 4.7-4.11 dargestellt.

Exemplarisch sind die RT-PCR-Ergebnisse der Patienten 2, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 17, 19 in den Abb. 4.7-4.11 wiedergegeben. Bei der Auswahl der Patienten wurde versucht, Patienten unterschiedlichen Alters und mit unterschiedlichen Herzfehlern darzustellen, um einen Überblick über das Expressionmuster in der weiteren Entwicklung und bei den unterschiedlichen Fehlbildungen zu geben. Außerdem wurde versucht, die Patienten auszuwählen, von denen mehrere

Gewebeproben unterschiedlicher Lokalisation vorhanden waren um evtl. Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Vorhof und Ventrikel zu erkennen.

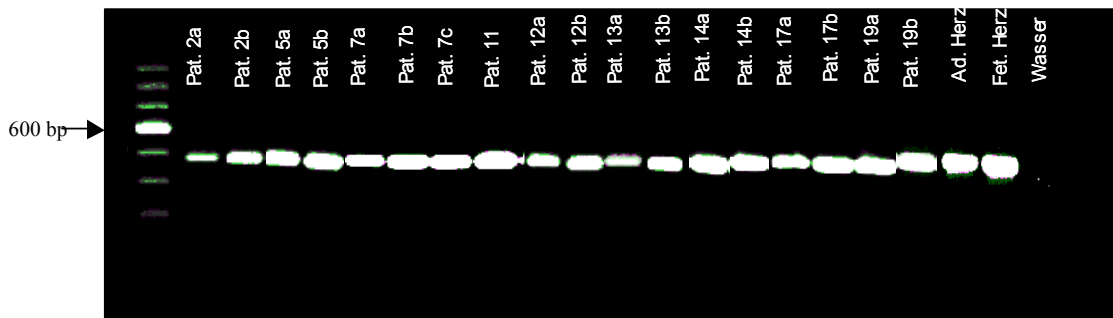


Abb. 4.7: ECE-1a mit cDNA von humanen Herzgewebeproben als Matrize (s. Tab. 4.2)

Zum Vergleich ist auch die Expression von ECE-1a auf mRNA-Ebene in adultem und fetalem Herzen abgebildet.

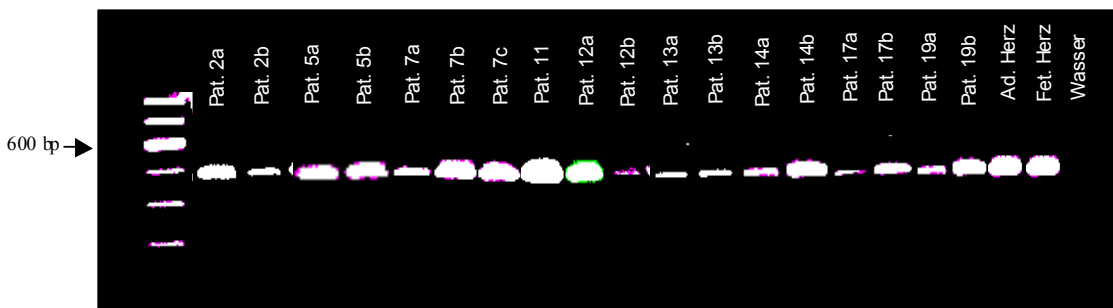


Abb.4.8: ECE-1b mit cDNA von humanen Herzgewebeproben als Matrize (s. Tab. 4.2.).

Zum Vergleich ist auch die Expression von ECE-1b auf mRNA-Ebene in adultem und fetalem Herzen abgebildet.



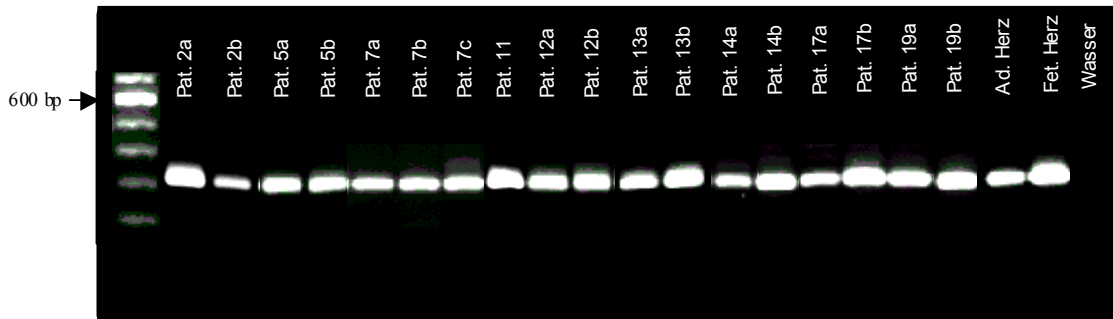


Abb.4.9: ECE-1c mit cDNA von humanen Herzgewebeproben als Matrize (s. Tab. 4.2).

Zum Vergleich ist auch die Expression von ECE-1c auf mRNA-Ebene in adultem und fetalem Herzen abgebildet.

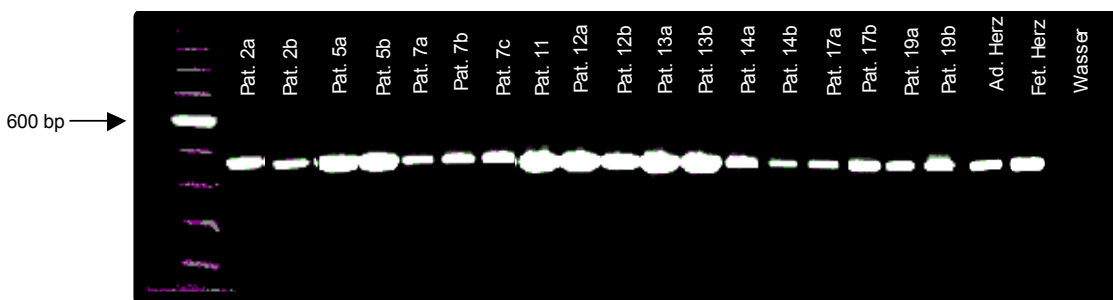


Abb.4.10: Nkx2.5 mit cDNA von humanen Herzgewebeproben als Matrize (s. Tab. 4.2).

Zum Vergleich ist auch die Expression von Nkx2.5 auf mRNA-Ebene in adultem und fetalem Herzen abgebildet.

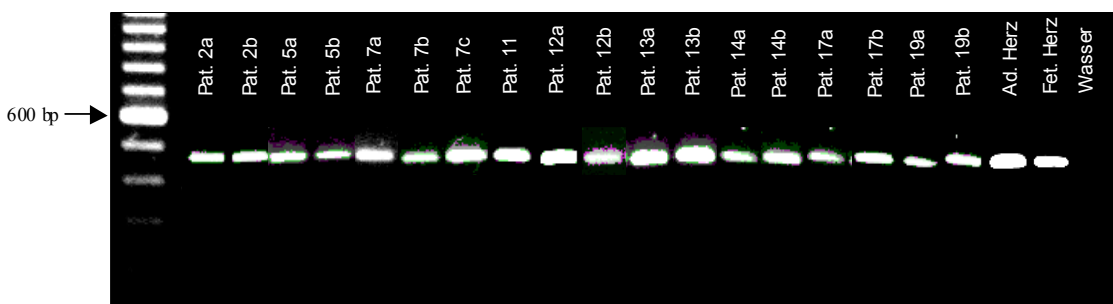


Abb. 4.11: GAPDH mit cDNA von humanen Herzgewebeproben als Matrize (s. Tab. 4.2).

Zum Vergleich ist auch die Expression von ECE-1c auf mRNA-Ebene in adultem und fetalem Herzen abgebildet.

Mittels RT/PCR konnte hier also erstmals die Koexpression von Nkx2.5 und den drei ECE-Isoformen im kardialen Gewebe von Patienten mit kongenitalen Herzfehlbildungen nachgewiesen werden. Unterschiede hinsichtlich des Gewebeursprungs und des Alters waren jedoch auf RT/PCR-Ebene nicht nachzuweisen.

## 4.2 Ergebnisse des RPA

Als zweiter Schritt wurden Ribonuclease-Protection-Assays (RPA) sowohl auf RNA der H9c2-Zellen (Kardiomyoblasten der Ratte) als auch auf der aus den humanen Gewebeproben isolierten RNA durchgeführt. Der Vorteil gegenüber anderen RNA-Nachweis-Verfahren liegt in der Möglichkeit, mehrere Gene in nur einem Ansatz nachzuweisen. Aufgrund der unterschiedlichen 5'-Enden der ECE-1-Isoformen können die drei Isoformen ECE-1a, -b, -c in einem einzigen Ansatz nachgewiesen werden. Ein weiterer Vorteil des RPA gegenüber der RT/PCR besteht darin, daß mit dem ersteren eine quantitative Aussagen möglich sind. Aufgrund der zum Teil nur sehr geringen isolierten RNA-Mengen und der (bei den humanen Gewebeproben) z.T. stark degradierten RNA war es nicht möglich alle Gewebeproben der Patienten mittels RPA zu untersuchen.

Die einzelnen Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

### 4.2.1 RPA mit H9c2-Kardiomyoblasten-RNA

Die Länge der Ratten-ECE-1-RPA-Sonde nach in-vitro Transkription mit T7-Polymerase beträgt 547 Nukleotide (nt). Nach Inkubation mit RNA ergeben sich für die protektierten Fragmente Größen von 439 nt und 342 nt, die den Isoformen ECE-1c und 1b entsprechen. Ein ECE-1a-Signal, dem eine Bande bei 262 nt entsprechen würde, konnte in H9c2-Zellen nicht detektiert werden (Abb. 4.12).

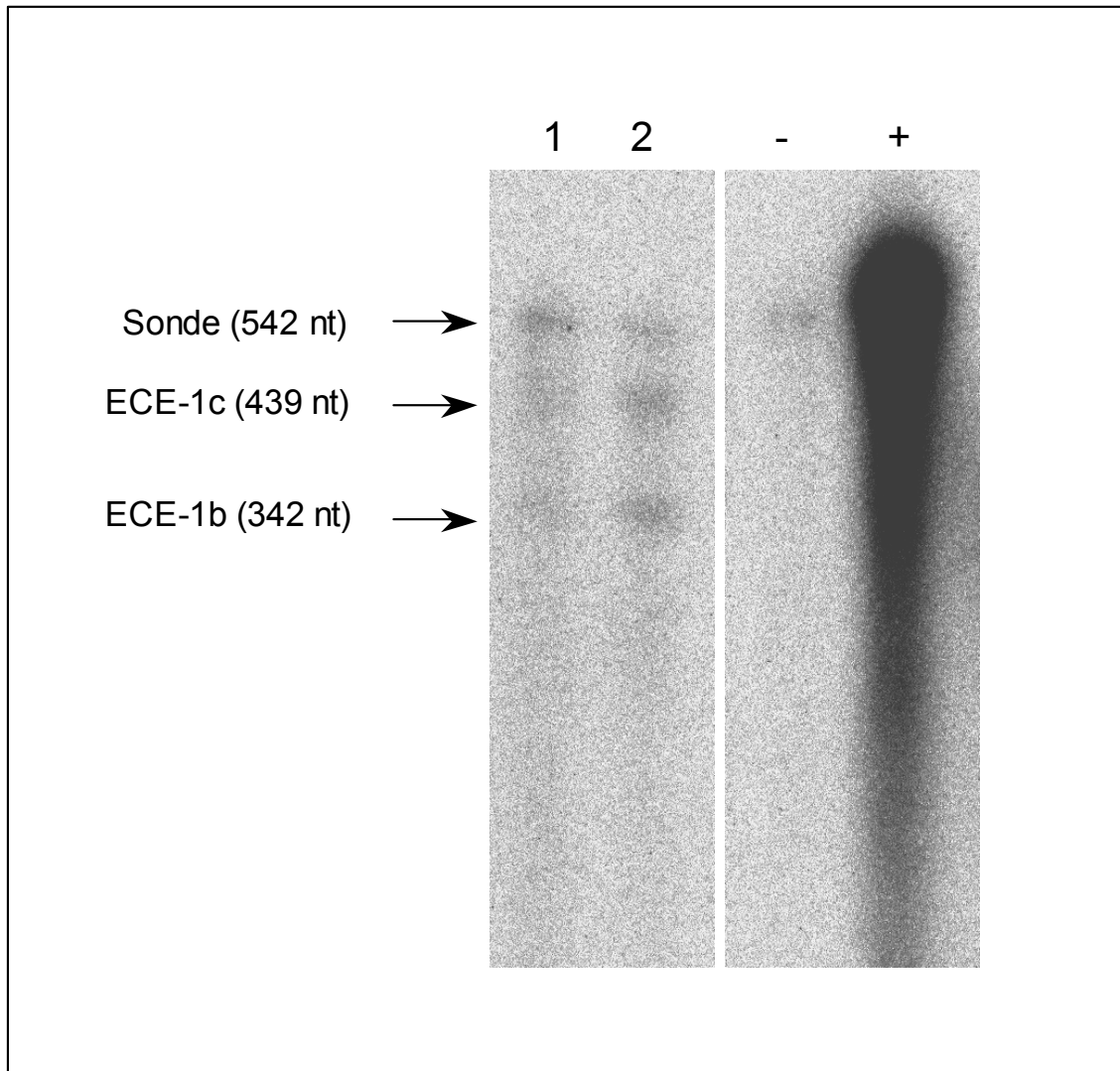


Abb. 4.12: Expression der ECE-1-mRNA-Isoformen in H9c2-Zellen mittels RPA.

Gesamt-RNA wurde mit einer Antisense-RNA-Sonde (Gesamtlänge 547 nt) hybridisiert. Das protektierte Fragment mit einer Länge von 439 nt entspricht der ECE-1c-Isoform. ECE-1b wird durch eine Bande von 342 nt repräsentiert. ECE-1a würde einer Bande von 262 nt entsprechen.

Linie 1: 10 µg RNA; Linie 2: 20 µg RNA; -/+ : Hefe-RNA mit/ohne RNase als Kontrollreaktion

#### 4.2.2 RPA mit RNA aus humanen Gewebeproben

Die Länge der humanen ECE-1-RPA-Sonde nach in-vitro-Transkription mit T7-Polymerase beträgt 423 Nukleotide. Nach Inkubation mit RNA ergeben sich für die protektierten Fragmente Größen von 302 nt und 264 nt für die Isoformen ECE-1c und -1b. Der Nachweis der ECE-1a-Isoform, dem ein Bande bei 177 nt entspricht, gelang auch in den humanen Herzgewebeproben nicht. Da aus den unterschiedlich großen Gewebeproben sehr unterschiedliche Mengen an RNA isoliert wurden, wurden die RPAs nicht mit standardisierten RNA-Mengen durchgeführt. Exemplarisch sind hier einige RPAs auf Patientengewebe, sowie auf gesunden fetalem und adultem Herzen (Clontec) abgebildet (Abb.4.13).

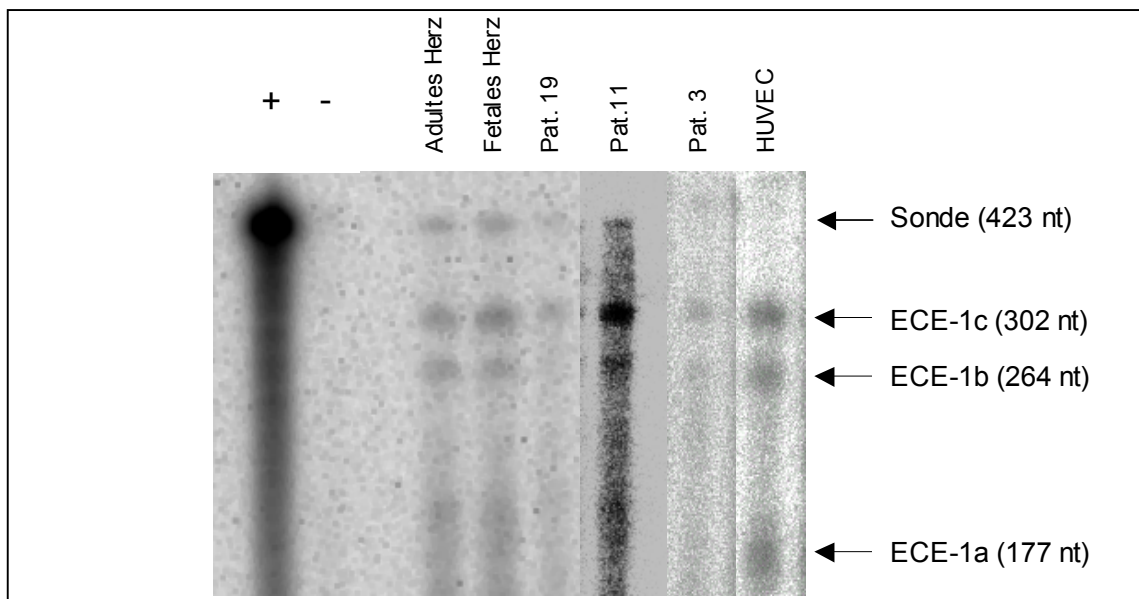


Abb. 4.13: RPA auf humanen Gewebeproben

Exemplarisch sind hier die Patienten 3 (11,3 µg RNA), 11 (12 µg RNA) und 19 (18 µg RNA) sowie adultes und fetales Herz (je 2 µg Poly-A+-RNA) abgebildet. Sowohl bei den Patientenproben als auch bei dem adulten und fetalen Herzen gelang nur der Nachweis der ECE-1c- und -1b-Isoformen. Als Positiv-Kontrolle ist ein RPA mit cDNA von HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) gezeigt, bei denen der Nachweis aller drei Isoformen gelang.

### 4.3 Western-Blot

Die Expression des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 in H9c2-Zellen wurde auf Proteinebene mittels Western-Blot nachgewiesen (Abb. 4.14). In Übereinstimmung mit der Literatur (Lints et al. 1993; Shiojima et al. 1996), die ein Molekulargewicht von 34-35 kDa beschreibt, konnte im Western-Blot eine Bande bei ca. 35 kDa nachgewiesen werden.

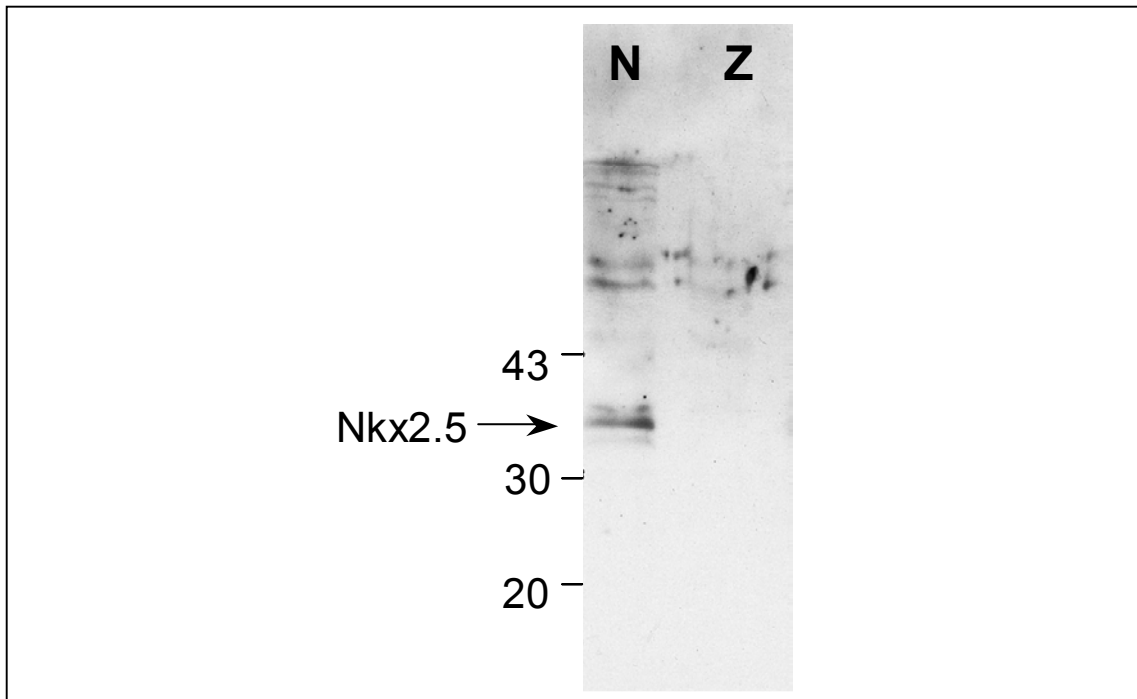


Abb. 4.14: Expression von Nkx2.5-Protein in H9c2-Zellen

Nukleäre (N) und zytosolische (Z) Proteine aus H9c2-Zellen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Der Western-Blot wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Nkx2.5 durchgeführt. Die Zahlen geben das Molekulargewicht in kDa an.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, daß ECE-1 und Nkx2.5 in H9c2-Kardiomyoblasten koexprimiert werden und daß – zumindest auf mRNA-Ebene – auch eine Koexpression im sich entwickelnden Rattenherzen und im kardialen Gewebe von Patienten mit angeborenen Herzfehlern angenommen werden kann.

Das Expressionsmuster der drei hier untersuchten ECE-Isoformen und des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 im Herzgewebe von Patienten mit angeborenen Herzfehlern scheint sich zumindest auf mRNA-Ebene nicht von dem im „gesunden“ fetalem und adultem Herzgewebe zu unterscheiden.

#### **4.4 Ergebnisse der Transfektionsexperimente bezüglich der verschiedenen ECE-1-Promotoren**

##### 4.4.1 Konsensussequenzen für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 in den alternative ECE-1-Promotoren

Zunächst wurden die Sequenzen der drei alternativen humanen ECE-1-Promotoren (GI 4491014) mittels des Computerprogrammes Transfac (<http://www.motif.genome.ad.jp>) auf mögliche Nkx-2.5 Konsensussequenzen hin untersucht. Die Analyse ergab, daß der ECE-1a-Promotor an der Position – 424 in bezug auf den Translationsstartpunkt ein reverses und komplementäres Nkx2.5-Motiv (5'- TTTACAAgTgAgg – 3', Kernsequenz unterstrichen) enthält. Im ECE-1b-Promotor wurde an Position –1200 in bezug auf den Translationsstartpunkt eine mögliche Nkx2.5-Bindungsstelle (5'- ACCTCAAgTgATC – 3', Kernsequenz unterstrichen) gefunden. Der ECE-1c-Promotor enthält dagegen keine bekannte Nkx2.5-Konsensussequenz.

##### 4.4.2 Interaktion von ECE-1a – Promotor und Nkx2.5

Das Promotor-Reporter-Konstrukt, das 1206 bp (in bezug auf das a-Isoform spezifische Translationsstartkodon) des ECE-1a spezifischen Promotors

enthielt, wurde transient in H9c2-Zellen transfiziert. Eine Kotransfektion mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor bewirkte eine signifikante Abnahme der Standardluziferaseaktivität um 40% in Vergleich zu einer Kotransfektion mit einem leeren (d.h. ohne einkloniertes Insert) pCR3.1-Expressionsvektor (Abb. 4.15 A).

Zusätzlich wurde die Konsensussequenz von Nkx2.5 im ECE-1a-Promotor-Luziferase-Konstrukt durch gezielte PCR-Mutagenese verändert. Das Nkx-Motiv 5'-ACA**A**gTg-3' (Sinn-Strang, Position -421) wurde zu 5'-ACATg**C**g-3' mutiert. Die Transfektion mit diesem Reporterplasmid zeigte eine nicht signifikante Verminderung um ca. 20% der Luziferaseaktivität ( $p > 0.05$ ) im Vergleich zu dem Wildtyp (Abb. 4.15 B). Die Kotransfektion des mutierten ECE-1a-Promotor-Konstruktes mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor bewirkte im Vergleich zur Kotransfektion mit dem leeren pCR3.1-Plasmid hingegen eine signifikante Abnahme der Luziferaseaktivität um ca. 30% ( $p = 0.014$ ; Abb. 4.15 C).

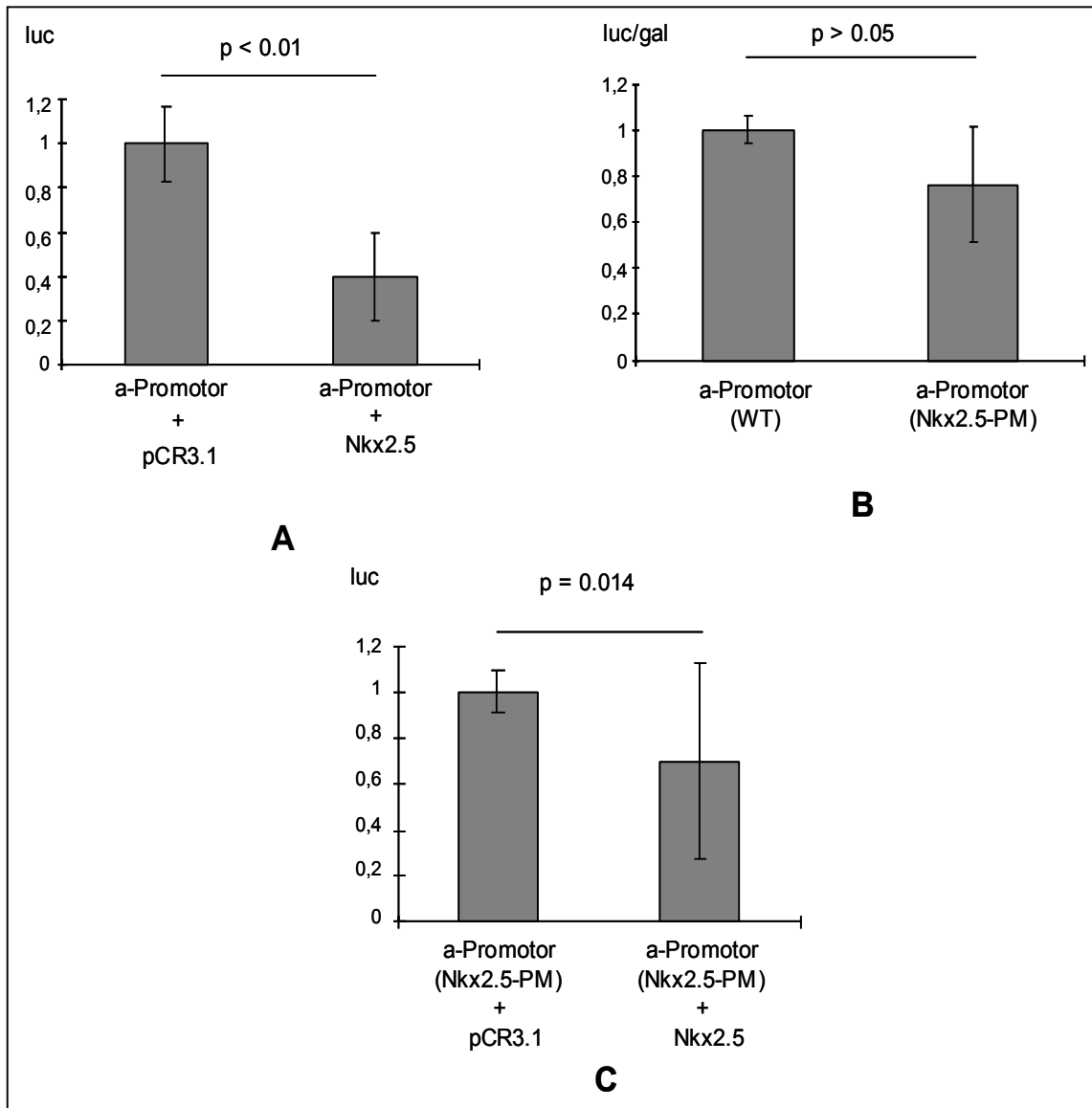


Abb.4.15: ECE-1a-Promotor-Funktion in H9c2-Zellen

(A) Kotransfektion eines ECE-1a-Promotor-Luziferase-Reporter-Plasmids mit einem Kontrollplasmid (pCR3.1, linke Säule) oder mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor (rechte Säule). Die Ordinateen repräsentieren die Luziferaseaktivität. (B) Vergleich der ECE-1a-Wildtyp-Promotor-Aktivität (linke Säule) mit einem Konstrukt, das innerhalb der Nkx2.5-Konsensussequenz an Position -421 eine Mutation enthält (rechte Säule). Die Ordinateen repräsentieren die standardisierte Luziferaseaktivität. (C) Kotransfektion des ECE-1a-Promotor-Luziferase-Konstruktes mit einer Mutation innerhalb der Nkx2.5-Konsensussequenz an Position -421 mit dem Kontrollplasmid (pCR3.1, linke Säule) oder mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor (rechte Säule). Die Ordinateen präsentieren die Luziferaseaktivität. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=6.



#### 4.4.3 Interaktion von ECE-1b-Promotor und Nkx2.5

Die Promotoraktivität des Luziferase-Reporter-Plasmides, das 1278 bp der ECE-1b-spezifischen regulatorischen Region enthält, wurde durch Kotransfektion mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor im Vergleich zur Kotransfektion mit einem leeren pCR3.1-Plasmid in H9c2-Zellen signifikant - um den Faktor 1,68 – erhöht (Abb.4.16 A).

Führt man den gleichen Versuchsansatz – d.h. eine Kotransfektion mit Nkx2.5-Expressionsvektor im Vergleich mit einer Kotransfektion mit einem leeren pCR3.1-Plasmid - mit einer ECE-1b-Deletionsmutante (-761) durch, die keine Konsensussequenz für Nkx enthält, zeigt sich kein Anstieg der Promotoraktivität (Abb. 4.16 C).

Auch hier wurde zusätzlich die Konsensussequenz durch spezifische PCR-Mutagenese verändert. Die Nkx-Bindungsstelle wurde von 5'- TCAA**A**g**T**g - 3' zu 5'- TCAT**T**g**C**g – 3' mutiert. Die Transfektion mit diesem Reporterplasmid zeigte eine signifikante Abnahme der ECE-1b-Promotoraktivität auf 63% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.16 B).

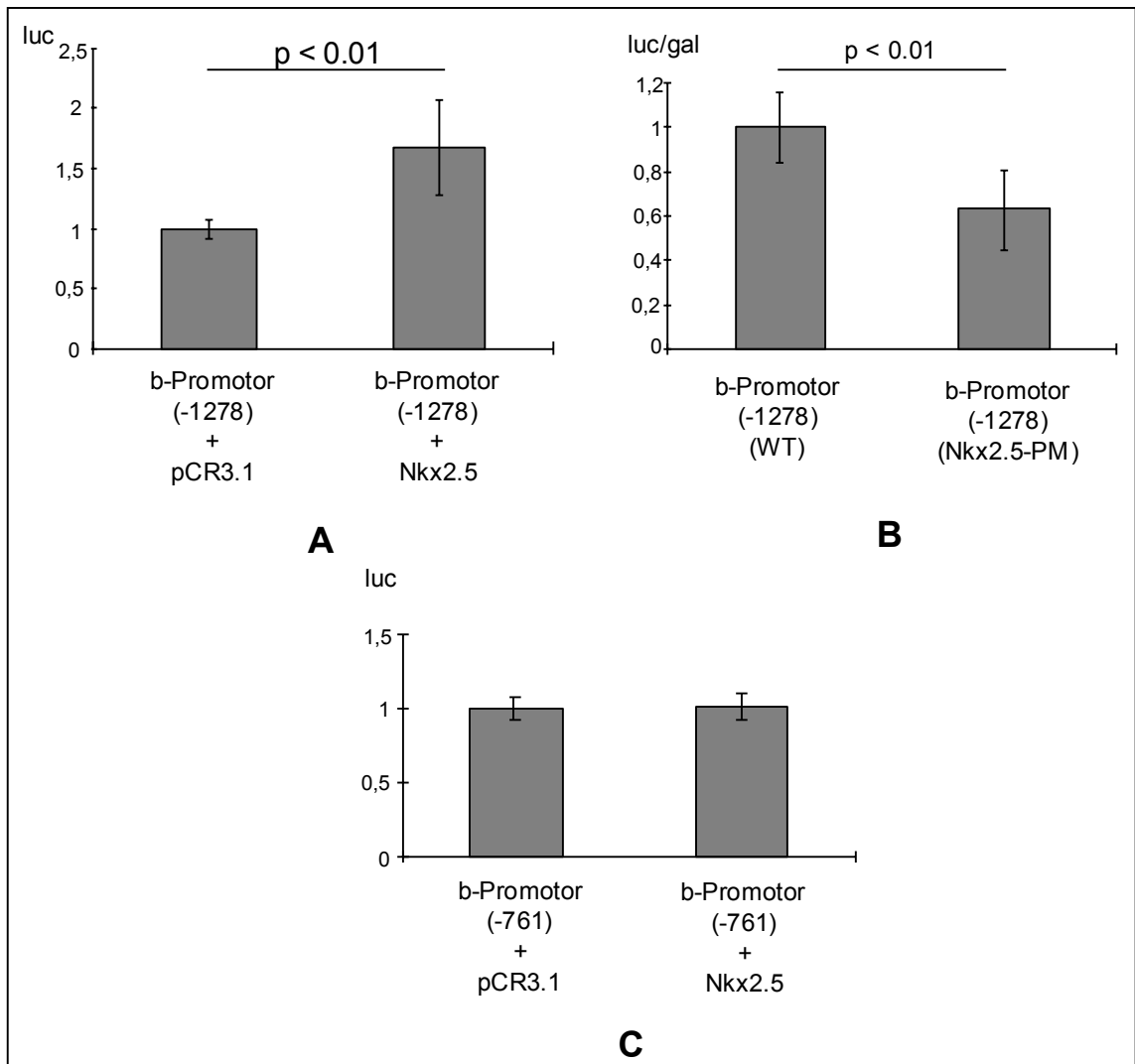


Abb. 4.16: ECE-1b-Promotor-Funktion in H9c2-Zellen.

(A) Kotransfektion eines Luziferase-Reporterplasmids, das 1278 bp des ECE-1b-Promotors enthält, mit einem Kontrollplasmid (pCR3.1, linke Säule) oder mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor (rechte Säule). Die Ordinate repräsentiert die Luziferase-Aktivität. (B) Vergleich der Luziferase-Aktivität des Wildtyp- ECE-1b-Promotor-Konstruktes (1278 bp; linke Säule) mit einem Konstrukt derselben Länge, das eine Mutation innerhalb der Nkx2.5-Konsensussequenz an Position -1197 enthält (rechte Säule). (C) Kotransfektion einer ECE-1b-Deletionsmutante (-761) mit einem Kontrollplasmid (pCR3.1; linke Säule) oder mit einem Nkx2.5-Expressionsvektor (rechte Säule). Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ .

#### 4.4.4 Interaktion von ECE-1c-Promotor und Nkx2.5

Die Kotransfektion eines 969 bp langen (auch hier in bezug auf den Translationsstartpunkt) ECE-1c-spezifischen Promotor-Fragmentes im Luziferase-Reporter-Vektor zusammen mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor in H9c2-Zellen bewirkte einen deutlichen Anstieg der ECE-1c-Promotoraktivität um den Faktor 2,8 im Vergleich zu dem leeren pCR3.1-Vektor (Abb. 4.17).

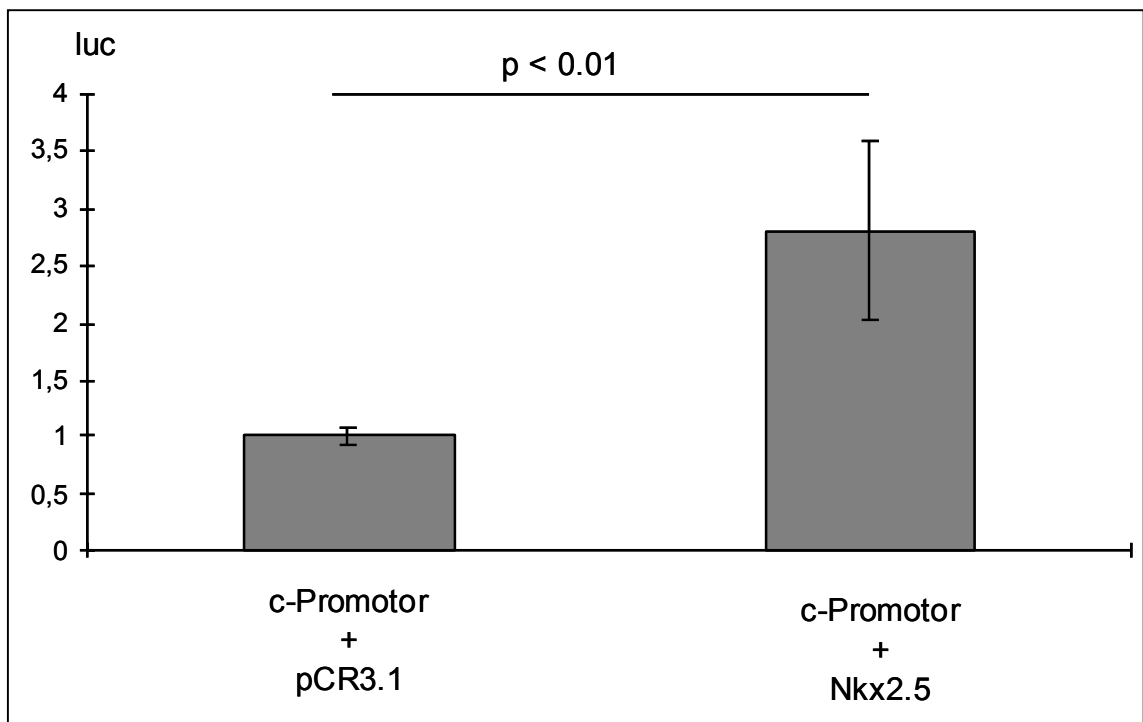


Abb.4.17: ECE-1c-Promotor-Funktion in H9c2-Zellen.

Kotransfektion eines Luziferase-Reporter-Plasmids, das 969 bp des ECE-1c-Promotors enthält, mit einem Kontrollplasmid (pCR3.1, linke Säule) oder mit dem Nkx2.5-Expressionsvektor (rechte Säule). Die Ordinate präsentiert die Luziferaseaktivität. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 6.

## 4.5 Bandshift-Analyse

### 4.5.1 Ergebnisse der Bandshift-Analyse

Um eine potentielle Protein-DNA-Interaktion zu untersuchen, wurden unter Verwendung von Oligonukleotiden, die eine Nkx2.5-Konsensus-Sequenz - wie sie in der obigen Analyse (s.4.4.1) im ECE-1a- und ECE-1b-Promotor gefunden wurden - enthalten EMSAs durchgeführt.

#### 4.5.1.1 Bandshift-Analyse mit Kernproteinen

Die Bindungsreaktion zwischen Proteinen aus Zellkernextrakten von H9c2-Zellen und Oligonukleotiden, die die Konsensussequenz des ECE-1b-Promotors enthalten, ergab drei geshiftete Banden (Abb. 4.18). Die Zugabe einer steigenden Menge nicht-markierter Oligonukleotide zwecks Konkurrenz (Spur 1-3) zeigte eine progressive Abnahme der Bandintensität als Hinweis für die Spezifität des Bandshifts.

Analoge Experimente in Hinblick auf den ECE-1a-Promotor zeigten keinen eindeutigen Bandshift (Abb. 4.18).

#### 4.5.1.2 Bandshift-Analyse mit zytosolischen Proteinen

Die Verwendung zytosolischer Proteine von H9c2-Zellen ergab lediglich eine Bande anderer Größe (Abb. 4.18, Spur Z).

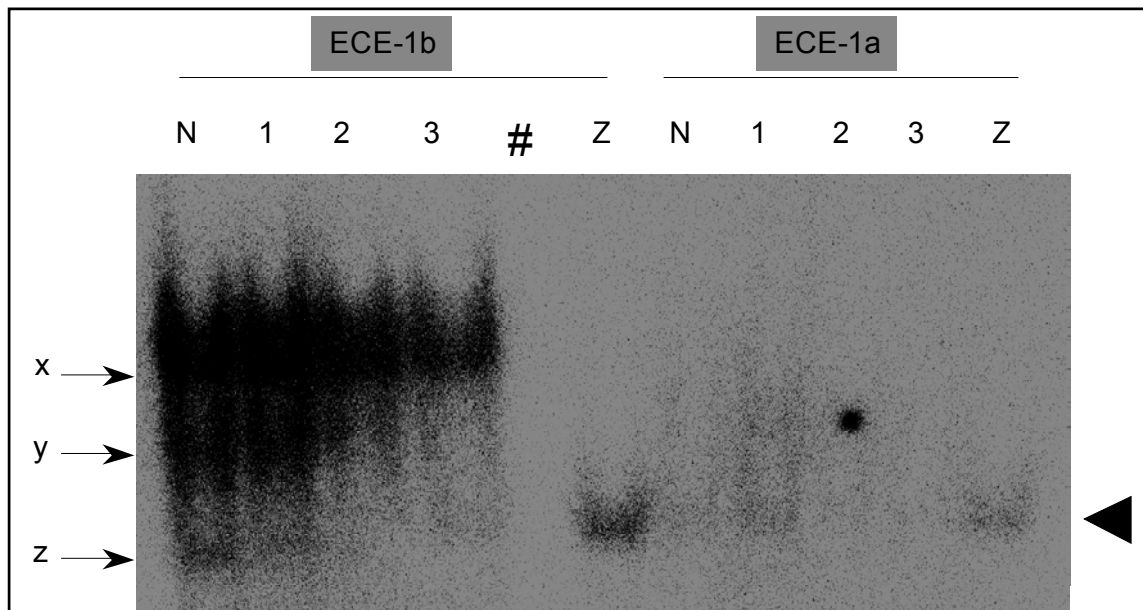


Abb. 4.18: Protein-DNA-Interaktion von nukleären und zytosolischen Proteinen aus H9c2-Zellen mit der Nkx2.5-Konsensussequenz im ECE-1a- und -1b-Promotor.

Die Bindungsreaktion wurde mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (ODN), die die Konsensussequenz des ECE-1a- (rechts) und ECE-1b-Promotors (links) enthalten, und nukleären (N) oder zytosolischen (Z) Proteinen durchgeführt. Spuren 1, 2, 3: Konkurrenzexperimente mit zunehmenden Mengen nicht-markierter ODNs (0,06 bis 1 pmol pro Bindungsreaktion). Die Pfeile markieren die geschifteten Banden. Das Dreieck markiert die Signale mit zytosolischen Proteinen.

#### 4.5.1.3 Bandshift-Analyse mit rekombinantem Protein

Zusätzlich zu den Versuchen mit Kernproteinen wurde der EMSA auch mit einem rekombinanten Nkx-2.5-Protein durchgeführt. Hier zeigten sich zwei geschiftete Banden bei dem Oligonukleotid, das die Nkx-2.5-Konsensussequenz des ECE-1b-Promotors enthält. Die obere Bande repräsentiert einen spezifischen Shift, der durch Zugabe eines Nkx-2.5-spezifischen Antikörpers komplett „supergeshiftet“ werden konnte (Abb. 4.19, Spur 3). Ein Supershift konnte auch nicht durch Zugabe eines unspezifischen Antikörpers (Spur 4) erreicht werden, was ein weiterer Hinweis für die Spezifität des Supershiftes ist.

Die untere Bande ist höchstwahrscheinlich unspezifisch (wahrscheinlich hervorgerufen durch Transkriptionsfaktoren, die während der gekoppelten Transkriptions-Translationsreaktion vorhanden waren). Im Gegensatz zum ECE-1b-Promotor konnte ein Bandshift nicht mit einem Oligonukleotid erzielt werden, das die Konsensussequenz für Nkx-2.5 des ECE-1a-Promotors enthielt (Abb. 4.19, Spur 1).

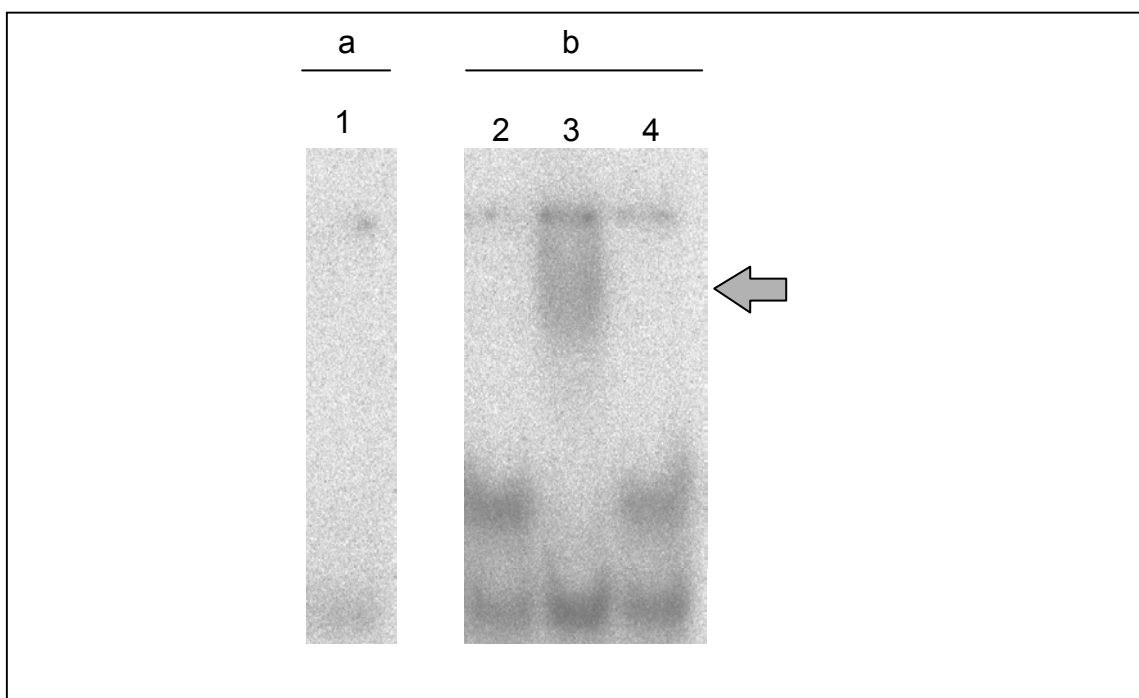


Abb.4.19: Bindungsverhalten von rekombinantem Nkx2.5-Protein an die Konsensussequenz im ECE-1a- und -1b-Promotor

Rekombinantes Nkx2.5-Protein in einer *in vitro* Transkriptions-/ Translationsreaktion synthetisiert. „a“ und „b“ stehen für den ECE-1a- bzw. -1b-Promotor, nach denen die ODN-Sequenzen, die im EMSA eingesetzt wurden, generiert wurden. Spur 1 und 2: ohne Antikörper; Spur 3: Anti-Nkx2.5-Antikörper; Spur 4: Kontrollantikörper. Der Pfeil markiert die Position der supergeschifteten Bande in Spur 3.