

## **3 EINLEITUNG**

### **3.1 Identifizierung der Endotheline**

Zunächst wurde durch Hickey et al. 1985 ein vasokonstriktorisches Faktor beschrieben, der 1988 durch die Arbeitsgruppe von T. Masaki (Yanagisawa et al., 1988) aus einer Endothelzellkultur isoliert wurde und die Bezeichnung Endothelin (ET) erhielt. Das Screening einer humanen genomischen DNA-Bank ergab drei verschiedene Gene, die für die sogenannten Präproendotheline (ppET-1, -2, -3) kodieren. Diese Vorstufen der Endotheline sind Isopeptide mit hoher Übereinstimmung der Aminosäuresequenz bei einer Länge von je 21 Aminosäuren. Endothelin 2 (ET-2) unterscheidet sich in 2 Aminosäuren und Endothelin 3 (ET-3) unterscheidet sich in 6 Aminosäuren zu ET-1 (Inoue et al., 1989a).

### **3.2 Expression, Synthese und Abbau der Endotheline**

#### **3.2.1 Expression**

Das Gewebeexpressionsmuster von ET-1 umfasst das Herz, die Lunge, die Niere, die Leber, das Pankreas, den GIT, den Testis und das ZNS (Firth und Ratcliffe, 1992). Zelltypspezifisch konnte die ppET-1 mRNA nachgewiesen werden u.a. in Endothelzellen, VSMC, Astrozyten, Neuronen, Kardiomyozyten, glomerulären Mesangialzellen, Bronchial- und Intestinalepithel, Makrophagen und Mastzellen (Rubanyi und Polokoff, 1994; Kedzierski et al., 2001). Somit ergibt sich ein breites Verteilungsmuster des ET-1. Da im Blutplasma nur pikomolare Konzentrationen von ET-1 nachgewiesen werden konnten, wird hauptsächlich eine abluminale auto- und parakrine Sekretion des ET-1 von Endothelzellen angenommen (Battistini et al., 1993; Yoshimoto et al., 1991; Wagner et al., 1992; La und Reid, 1995).

ET-2 konnte in Dünndarm und Kolon und minimal in der Skelettmuskulatur, im Herzen und im Magen nachgewiesen werden (Davenport et al., 1991; Firth und Ratcliffe, 1992). Im Darm erfolgt die Expression in Epithelzellen (Kedzierski et al., 2001).

Endothelin-3 mRNA wird ähnlich weit verbreitet exprimiert wie ET-1, vor allem aber in Dünndarm, Kolon, Lunge, Niere (Firth und Ratcliffe, 1992; Rubanyi und Polokoff, 1994). Der zellspezifische Nachweis gelang in neuronalen Zellen, renalen Tubuluszellen und Epithelzellen des Intestinums (Matsumoto et al., 1989).

### 3.2.2 Synthese

Aus dem Präproendothelin (ppET-1) wird durch proteolytische Spaltung das aktive Endothelin gebildet. In der Translation der mRNA des ppET wird eine inaktive Vorstufe mit 212 Aminosäuren erstellt (Inoue et al., 1989b). Daraufhin wird das Signalpeptid im Lumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums abgespaltet. Dadurch wird das Proendothelin-1 gebildet (Rubanyi und Polokoff, 1994; Webb, 1997). Das Proendothelin-1 wird durch Furin, eine in der Golgimembran lokalisierte Endopeptidase zwischen Arginin<sup>52</sup> und Cystein<sup>53</sup> sowie zwischen Arginin<sup>92</sup> und Alanin<sup>93</sup> zu big Endothelin-1-Lys<sup>91</sup>-Arg<sup>92</sup> gespalten (Denault et al., 1995). Furin spaltet des Weiteren noch viele andere Vorläuferproteine wie z.B. die der Wachstumsfaktoren, der Serumproteine, der Matrixmetalloproteinasen, von Rezeptoren und bakteriellen Exotoxinen (Nakayama, 1997). Im Anschluss an die Furin-Spaltung werden Lysin und Arginin am C-terminalen Ende durch eine Carboxypeptidase entfernt unter Bildung von big Endothelin-1 (big ET-1) mit 38 Aminosäuren beim Menschen. Durch weitere Spaltung zwischen Trp<sup>21</sup> und Val<sup>22</sup> mit Hilfe des Endothelin-Konvertierungsenzym (ECE) ergibt sich das aktive ET-1 sowie ein Rest von 19 Aminosäuren (Xu et al., 1994). Das ET-1 ist in seiner vasokonstriktorisches Aktivität 140-mal stärker wirksam als big ET-1 (Kimura et al., 1989). Das ECE kristallisierte sich somit zum Schlüsselenzym bei der Bildung von ET-1. In ähnlicher Weise werden ET-2 und ET-3 gebildet.

Ein alternativer Syntheseweg geht über die humane Chymase, eine Chymotrypsin-ähnliche Serin-Protease. Sie spaltet big ET-1 in ein aus 31 Aminosäuren bestehendes Peptid: Endothelin-1(1-31) (ET-1(1-31)). Dieses neue Mitglied der Endothelinfamilie kann wiederum durch ECE in ET-1(1-21) konvertiert werden. Die kardiovaskulären Effekte des ET-1(1-31) in der rostralen-ventrolateralen Medulla (durch Injektion ausgelöst) scheinen ein Ergebnis der Umwandlung von ET-1(1-31) in ET-1(1-21) durch Aktivierung des ETA-Rezeptors zu sein (Lu et al., 2005).

### 3.2.3 Abbau

Zirkulierendes ET-1 wird etwa zur Hälfte durch die neutrale Endopeptidase (NEP) in der ersten Lungenpassage (de Nucci et al., 1988; Abassi et al., 1992) abgebaut. Der restliche Teil des Plasma-ET-1 wird nach Bindung an den endothelialen ETB-Rezeptor internalisiert (Fukuroda et al., 1994).

### **3.3 Die Endothelinrezeptoren**

Die vasokonstriktorische Aktivität der Endotheline wird über Endothelinrezeptoren vermittelt. Beim Menschen wurden bisher zwei Endothelinrezeptor-Subtypen, Subtyp A (ETA) und B (ETB), beschrieben. ETA wurde zunächst beim Rind (Arai et al., 1990) und ETB wurde zunächst bei der Ratte nachgewiesen (Sakurai et al., 1990). Die humane Sequenz wurde isoliert und charakterisiert durch Hosoda et al., 1992 sowie Arai et al., 1993. Beide ET-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Transmembran-Rezeptoren mit einem extrazellulären Aminoterminus, einer transmembranären heptahelikalen Domäne und einem intrazellulären Carboxylende (Ohlstein et al., 1996). Ein dritter Endothelin-Rezeptor (ETC) wurde bisher nur aus *Xenopus laevis* (= afrikanischer Knallfrosch) kloniert (Karne et al., 1993) und bei Säugetieren bisher noch nicht identifiziert.

#### **3.3.1 Charakterisierung des ETA-Rezeptors**

Es besteht eine absteigende Bindungsaffinität für die drei Endotheline:  $ET-1 \geq ET-2 \geq ET-3$  (Sakurai et al., 1992) zum ETA-Rezeptor, der auf glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der großen und kleinen Blutgefäße (Hori et al., 1992), auf glatten Muskelzellen der Bronchien und auf Hepatozyten, Kardiomyozyten und Neuronen exprimiert wird (Kedzierski et al., 2001). Die Signaltransduktion des ETA-Rezeptors beinhaltet u.a. Stimulation von Gq-Proteinen, welche Phospholipase C aktivieren, worauf Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) sowie Diacylglycerol (DAG) gebildet werden. IP<sub>3</sub> führt zu einer Entleerung kalziumspeichernder Vesikel, wodurch es zu der Vasokonstriktion kommt (Simonson und Dunn, 1990; Stryer, 1994). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziummenge verursacht zusammen mit DAG eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Hierauf könnte eine mitogene Wirkung des Endothelins beruhen (Simonson und Herman, 1993).

#### **3.3.2 Charakterisierung des ETB-Rezeptors**

An ETB binden ET-1, ET-2 und ET-3 mit gleicher Affinität. ETB wird exprimiert auf Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten, epithelialen Zellen des renalen Sammelrohres, Kardiomyozyten, Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems und Gefäß-Endothelzellen (Kedzierski et al., 2001). Die Signaltransduktion ist komplex und kann zelltypabhängig erfolgen wie für ETA, entweder über Koppelung an ein hemmendes G-Protein und Inhibition der cAMP-Produktion und Aktivierung der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Ionenpumpe (Aramori und Nakanishi, 1992; Koh et al., 1992), oder über die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Achse unter Synthese von EDRF/NO in Endothelzellen mit transienter ET-vermittelter Vasodilatation (Hirata et al., 1993;

Haynes und Webb, 1994) oder es erfolgt Internalisierung des ET-1-ETB-Rezeptorkomplexes und lysosomaler Abbau (Fukuroda et al., 1994; Oksche et al., 2000).

### **3.4 Die biologische Bedeutung der Endotheline**

#### Die vasokonstriktorische Wirkung der Endotheline:

Die Endotheline sind starke Vasokonstriktoren (Yanagisawa et al., 1988; Hemsén et al., 1991). Stärker vasokonstriktorisch wirksam ist wahrscheinlich nur noch Urotensin-II (Ames et al., 1999). Zuerst kommt es zu einer kurzen Gefäßdilatation durch Stimulation des endothelialen ETB unter Bildung von NO und Prostacyclin. Die anschließende lang anhaltende Vasokonstriktion wird induziert über Bindung an ETA auf VSMC (de Nucci et al., 1988; Emori et al., 1990; Filep et al., 1991; Hirata et al., 1993; Richard et al., 1995). Die intraarterielle Infusion von ET-1 in die Arteria brachialis gesunder Probanden ergab eine Vasokonstriktion. Diese ist antagonisierbar durch gleichzeitige Applikation eines selektiven ETA-Rezeptorantagonisten wie BQ-123 (Haynes und Webb, 1994). Haynes et al. (1995) unterstreichen die Bedeutung der Endotheline für den basalen Gefäßtonus.

#### Die angiogenetische Wirkung der Endotheline:

Das Endothelinsystem ist beteiligt an der Proliferation und Migration kultivierter Endothelzellen mittels Endothelin-1 über eine Aktivierung des ETB-Rezeptors (Morbidelli et al. 1995). Hierbei soll NO für die angiogenetischen Effekte verantwortlich sein (Noiri et al., 1997; Goligorsky et al., 1999). Demgegenüber steht die Beobachtung, dass es ETB-Rezeptor-vermittelt zu einer gesteigerten Apoptose in der Media der glatten Gefäßmuskulatur kommen soll (Cattaruzza et al., 2002). Des Weiteren gibt es Hinweise auf ein starkes angiogenetisches Potential von ET-1 und ET-3 bei der tumorinduzierten Angiogenese (Salani et al., 2000; Cruz et al., 2001, Rosanó et al., 2003).

#### Die Bedeutung der Endotheline bei Herzinsuffizienz und Herzinfarkt:

Watanabe et al. zeigten 1991, dass es durch Infusion eines ET-1-Antikörpers bei Ratten nach einem Myokardinfarkt zu einer Verkleinerung des nekrotischen Areals kommt. Bei Ratten mit Infarkt-assoziiertes Herzinsuffizienz verbesserte der ETA-Antagonist BQ-123 die 12-Wochen-Überlebensrate der Tiere von 43 auf 85 % (Sakai et al., 1996). Auch konnten Wei et al. 1994 eine erhöhte Plasmakonzentration von ET-1 bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz feststellen, die mit der Erkrankungsschwere korrelierte. In diesem Zusammenhang wurde von Krum et al. 1998 eine mit dem ACE-Hemmer Enalapril vergleichbare, blutdrucksenkende Wirksamkeit des nicht selektiven ET-Rezeptorantagonisten Bosentan bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen.

### Die mitogene Wirkung der Endotheline:

Zunächst konnten Kusahara et al. 1990 die Synthese von ET-1 in diversen humanen Karzinomzelllinien beweisen. Einen erhöhten ET-1-Spiegel in humanem Mammakarzinomgewebe zeigten Yamashita et al. 1991. Demgegenüber kommt es beim metastasierten kolorektalen Karzinom zu erhöhten Plasmaspiegeln (Shankar et al., 1998). Die direkte mitogene Wirkung von ET-1 auf Prostatakarzinom- und Gliomzellen untersuchten MacCumber et al. 1990 sowie Nelson et al. 1995. Stiles et al. stellten 1997 sogar eine Korrelation zwischen dem Malignitätsgrad und der Expression von ET-1 bei astrozytären Tumoren fest. Im Rahmen einer Therapieoption führte nach Hsu und Pfahl 1998 eine Hemmung der ET-1-Synthese bei Prostatakarzinomzellen zu einer Verminderung des Tumorwachstums und eine Phase-1-Studie von Kopetz et al. 2002 ergab eine Reduktion des Knochenschmerzes und einen Abfall der PSA-Spiegel innerhalb eines Monats bei den betroffenen Patienten. Über eine Blockade des ETB-Rezeptors gelang Lahav et al. 1999 bei Melanomzellen eine Verminderung des Zellwachstums und eine Induktion der Apoptose.

### Bedeutung der Endotheline in der Pathophysiologie des akuten und chronischen

#### Nierenversagens:

Bereits Orisio et al. zeigten 1993 eine Korrelation des Ausmaßes des Nierenversagens mit den renalen ET-1-Spiegeln. Zu der Entstehung der Glomerulosklerose und im Anschluss daran zu einer fortschreitenden Niereninsuffizienz kam es bei einer transgenen Expression von ET-1 bei Mäusen und einer transgenen Expression von ET-1 bei Ratten (Hochoer et al., 1996; Hochoer et al., 1997). Dementsprechend verminderte die Infusion eines ETA-Antagonisten bei Ratten mit akuter oder chronischer Niereninsuffizienz die Proteinurie, steigerte die Glomerulärfiltrationsrate und verlängerte die Überlebensrate der Tiere (Benigni et al., 1993; Chan et al., 1994; Hochoer et al., 2001).

#### Die Bedeutung der Endotheline für die Ontogenese:

Bisher konnte nur bei Mäusen ein Zusammenhang zwischen den Endothelinen und der Ontogenese gezeigt werden. Zum einen weisen Knock out-Mäuse für ET-1 und ETA kraniofaziale Fehlbildungen, Ventrikelseptumdefekte, Fehlbildungen des kardialen Ausflusstraktes und der grossen Gefäße auf (Kurihara et al., 1994 und 1995; Clouthier et al., 1998). Zum anderen haben Knock out-Mäuse für ET-3 und ETB eine Störung der Melanozytenmigration und eine dem Morbus Hirschsprung ähnliche Erkrankung (Baynash et al., 1994). Dies passt zu dem Nachweis einer ET-3- oder ETB-Mutation bei Patienten mit Morbus Hirschsprung (Puffenberger et al., 1994; Shanske et al., 2001).

### **3.5 Die Endothelin-Konvertierungsenzyme**

#### **3.5.1 Identifizierung und Genstruktur**

Die Existenz eines Endothelin konvertierenden Enzyms wurde bereits bei der Beschreibung von ET-1 postuliert (Yanagisawa et al. 1988). Dieses wurde durch Waxman et al. 1994 aus einer humanen Endothelzelllinie (EA.hy926) isoliert und enzymkinetisch untersucht. Im Anschluss daran erfolgte die Klonierung des humanen Endothelinkonvertierungsenzym-1 (ECE-1) durch Schmidt et al., 1994 (Mensch) und Xu et al., 1994 (Rind). Das homologe Endothelinkonvertierungsenzym-2 (ECE-2) wurde durch Emoto und Yanagisawa, 1995 kloniert. Das humane *ECE1* Gen besteht aus 21 Exonen und erstreckt sich über mehr als 70 kbp. Es ist lokalisiert auf dem kurzen Arm des Chromosom 1 (Valdenaire et al., 1995). Humanes ECE-1 wird in vier Isoformen a bis d exprimiert: a (Shimada et al., 1995a), b (Schmidt et al., 1994), c (Schweizer et al., 1997), d (Valdenaire et al., 1999a). Diese unterscheiden sich im N-Terminus, aber nicht hinsichtlich ihrer Aktivität oder Substratspezifität. Die Isoform c ist neben b die Hauptisoform hinsichtlich Umfang der mRNA-Expression in den meisten untersuchten humanen Geweben (Schweizer et al., 1997). Es entstand eine uneinheitliche Nomenklatur aufgrund fast gleichzeitiger Sequenzierung: Shimada et al. (1995 a/b) gaben den aus der Ratte sequenzierten Produkten die Namen ECE-1 $\alpha$  und ECE-1 $\beta$ . Valdenaire et al. (1995) gaben den humanen sequenzierten Produkten die Bezeichnungen ECE-1a und ECE-1b. Das ECE-1 $\beta$  der Ratte ist identisch mit dem humanen ECE-1a und das ECE-1 $\alpha$  der Ratte entspricht dem humanen ECE-1c (Schweizer et al., 1997; Turner et al., 1998; Valdenaire et al., 1999a). ECE-2 wurde zunächst als cDNA in Rindergewebe entdeckt (Emoto und Yanagisawa, 1995). Die Klonierung des humanen ECE-2 erfolgte durch Lorenzo et al. 2001 sowie die Charakterisierung der drei Isoformen ECE-2A und ECE-2b ebenfalls durch Lorenzo et al. 2001 und des ECE-2c durch Funke-Kaiser et al. 2002 [„Homo sapiens endothelin-converting enzyme-2C (ECE2) mRNA. Genebank accession AF521189, GI:21780270“]. ECE-3 wurde bisher nur aus der bovinen Iris extrahiert und auf Proteinebene charakterisiert (Hasegawa et al., 1998).

#### **3.5.2 Biochemische Struktur und Enzymkinetik**

Das ECE-1 ist eine membrangebundene neutrale Zink-Metalloprotease und gehört zur Gruppe der Typ II Membranproteine (d.h. der N-Terminus befindet sich im Zellzytoplasma; Schmidt et al., 1994; Xu et al., 1994; Turner und Murphy, 1996). Genau in diesem N-Terminus-Bereich unterscheiden sich die ECE-Isoformen in ihrer Proteinsequenz. Die Transmembrandomäne und der weitaus größere extrazytoplasmatische C-terminale Anteil mit der katalytischen Domäne

sind bei allen ECE-Isoformen identisch. ECE-1 bildet über eine Cystein-Disulfidbrücke ein Dimer, das unter reduzierenden Bedingungen in die Monomere zerfällt. Die Dimerisation erhöht die Substratumsatzgeschwindigkeit (Shimada et al., 1996). Des Weiteren ist eine Glykosylierung für die Enzymaktivität essentiell (Nelboeck et al., 1998). Das Molekulargewicht des einzelnen Molekül beträgt 120 kDa, das Molekulargewicht des Dimers 250 kDa. Die Peptidsequenzlänge der einzelnen ECE-1-Subtypen beträgt für ECE-1a: 758 Aminosäuren, für ECE-1b: 753 Aminosäuren und für ECE-1c: 754 Aminosäuren.

ECE-1 katalysiert effektiver die proteolytische Spaltung von big ET-1 (pH-Optimum etwa 7,4) als die von big ET-2 und big ET-3.

### **Exkurs zur Homologie zwischen ECE-1 und der neutralen Endopeptidase (NEP):**

Es besteht eine 37%ige Homologie zwischen ECE-1 und der NEP auf Proteinebene. NEP hat Bedeutung für den Metabolismus u.a. von Endothelin, Enkephalinen, ANP, Substanz P, Oxytocin und chemotaktischen Peptiden (Ishimaru und Shipp, 1995; Turner und Murphy, 1996; Turner und Tanzawa, 1997; Turner et al., 2001).

ECE-2 ist ebenfalls ein Typ II Transmembranprotein mit dem Molekulargewicht von ca. 130 kDa. Es besitzt eine zytoplasmatische N-terminale Domäne mit 82 Aminosäuren und eine C-terminale Domäne mit 682 Aminosäuren. Die Substratspezifität ist ähnlich der von ECE-1, das pH-Optimum bei 5,5 lässt den Schluss zu, dass es intrazellulär im sauren Milieu des trans-Golgi-Netzwerkes katalytisch aktiv ist (Emoto und Yanagisawa, 1995). Die Aminosäuresequenz ist zu 59% homolog mit ECE-1. Im C-terminalen Ende beträgt die Homologie sogar 71% (Emoto und Yanagisawa, 1995).

Bovines ECE-3 hat ein Molekulargewicht von 140 kDa, eine deutliche Substratspezifität für big ET-3 und ein pH-Optimum bei 6,6 (Hasegawa et al., 1998). Zusammen mit NEP, XCE (ECEL-1) und dem Blutgruppenantigen Kell bilden ECE-1 und ECE-2 die Neprilysinfamilie der Zink-bindenden Metalloproteasen (Turner und Tanzawa, 1997). ECE-1, ECE-2 und ECE-3 sind hemmbar durch Phosphoramidon, ein substituiertes Dipeptid. Ihre Aktivität ist nicht beeinflussbar durch Thiorphan, einen spezifischen Hemmstoff der neutralen Endopeptidase oder ACE-Hemmer (Matsumura et al., 1995; Turner und Murphy, 1996; Hasegawa et al., 1998).

### 3.5.3 Gewebeexpression von ECE

Korth et al., 1999, wiesen beim Menschen hohe mRNA- und Proteinspiegel in fast allen Gefäßendothelzellen unabhängig vom untersuchten Organ nach. Allerdings gibt es eine starke Differenz sowohl in den glatten Muskelzellen des gleichen Gefäßes als auch zwischen verschiedenen Gefäßen. Es wurde kein ECE-1 in humanen adulten Kardiomyozyten nachgewiesen. Jedoch gelang der ECE-1-Nachweis im gesamten respiratorischen System (außer im hyalinen Knorpel). Im GIT wurde eine geringe Konzentration des ECE-1 in den Epithelzellen und in der Tunica muscularis festgestellt, jedoch eine starke Konzentration im Plexus myentericus Auerbach und in den submukösen Plexus. Ebenso in den Azinuszellen des Pankreas. In den Nieren gelang der Nachweis hauptsächlich in den Glomeruli.

Schweizer et al., 1997, veröffentlichten zur isoformspezifischen mRNA-Expression der drei Isoformen ECE-1a, -b- und c. ECE-1c ist die Hauptisoform in Herz, Lunge, Niere, Leber, Nebenniere und Plazenta, ECE-1a ist die Hauptisoform nur in HUVEC. Die ECE-1b- und ECE-1d-Gewebeexpression ist nach Valdenair et al. (1999b) ähnlich stark in ECV304 (Endothelzelllinie), HUVEC, HSMC (Hautmastzelllinie), polynukleären Neutrophilen, MRC5 (Fibroblasten-Zelllinie) und Kardiomyozyten. In den Zellen der V. saphena allerdings wurde kein ECE-1b-Signal erhalten. Brand et al., 1998, zeigten im humanen Embryo der 4./5. Woche (Carnegie-Stadium 12 – 13) starke mRNA-Expression (ECE-1) im Endokard, Endothelzellen aller Arterien, in Hepatozyten und dem mesodermalem Gewebe um den Hauptbronchus. In der 5. und 6. Gestationswoche wiesen sie ECE-1-mRNA in kardialen und vaskulären Myozyten und Endothelzellen, im Mesoderm des gesamten Verdauungstraktes, im Pankreasepithel und –mesoderm sowie in Hepatozyten nach. Im Mesonephros kommt es zu einer Expressierung von ECE-1 im proximalen Tubulus, Mesenchym und Mesangium.

Immunhistochemische Untersuchung an Rattengeweben zeigten Expression von ECE-1 in Endothelzellen der Aorta, Lungenarterien und -venen, Interlobulärarterien der Niere und Leber, in der Portalvene und im Endokard. Es wurde nicht nachgewiesen in glatten Muskelzellen der Aorta (Takahashi et al., 1995). Hioki et al., 1991, wiesen jedoch eine ECE-Aktivität auch in Homogenaten aus bovinen glatten Gefäßmuskelzellen nach. Orzechowski et al., 1997, detektierten mittels RT-PCR ECE-1b mRNA in kultivierten humanen glatten Muskelzellen. Xu et al. und Ikura et al., 1994, wiesen ECE-1 Expression durch Northern-Blot-Analysen beim Rind in Lunge, Herz, Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Ovar, Uterus, Hoden, Skelettmuskel und ZNS nach. Die Gefäßendothelzellen der untersuchten Organe wurden durch in situ-Hybridisierung als Hauptexpressionsort festgestellt. Des Weiteren gab es ECE-1 mRNA-Signale im bovinen

Endokard und in Kardiomyozyten sowie in epithelialen Zellen der Lunge. Schwächere Signale in den Tubulusepithelzellen der Niere und den Epithelzellen der Nebenniere in Kortex und Mark. Die vier Isoformen haben eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation. ECE-1a und ECE-1c sind an der Zelloberfläche lokalisiert, ECE-1b und ECE-1d wurden intrazellulär gefunden und zeigten eine signifikante Co-Lokalisation mit einem Markerprotein für den Golgi-Apparat bei ECE-1b (Schweizer et al., 1997) bzw. eine erhöhte Konzentration in Endosomen (Muller et al., 2003).

Für ECE-2 sind bisher nur Gewebedaten für das Rind veröffentlicht (mRNA-Detektion mittels Northern Blot-Analysen). Es fanden sich große Mengen an ECE-2 mRNA in zerebralem Kortex, Zerebellum und Nebenniere. Schwache Signale gab es in Myometrium, Ovar und Hoden. Humane koronararterielle kultivierte Endothelzellen und HUVEC exprimieren ebenfalls ECE-2 mRNA (Emoto und Yanagisawa, 1995; Russell und Davenport, 1999). Nach den vorliegenden Daten scheint die ECE-2 mRNA-Expression insgesamt deutlich geringer als die von ECE-1.

### **3.5.4 Biologische Bedeutung der Endothelin-Konvertierungsenzyme**

#### **3.5.4.1 Entwicklung**

Homozygote ECE-1 „Knock-out“-Mäuse verstarben meist bereits intrauterin; die lebendgeborenen Mäuse lebten nur maximal 30 Minuten postpartal (Yanagisawa et al., 1998). Bei diesen Tieren ergaben sich folgende Befunde:

- a) Verengung der oberen Atemwege durch Fusion von thyreoidalem Knorpel, Hyoid und der Sphenoid-Basis.
- b) Schwere kraniofaziale Fehlbildungen (Mandibula-Hypoplasie, Hypoplasie des harten Gaumens und der temporalen Schädelknochen); Fehlen des Hauptteils der Zunge, der submandibulären und sublingualen Drüsengänge, des äußeren Gehörganges, des Malleolus und des Incus.
- c) Teilentwicklung der Thyreoidea und Parathyreoidea.
- d) Missbildung der herznahen Gefäße (periphere Gefäßdilataion, Hypoplasie des Aortenbogens zwischen linker Arteria carotis communis und Arteria subclavia, Fehlen der rechten Arteria subclavia, rechtsseitiger oder doppelter Aortenbogen).
- e) Konotrunkale Fehlbildungen am Herz (perimembranöser Ventrikelseptumdefekt, überreitende Aorta, doppelter Ausflusstrakt des rechten Ventrikels und persistierender Truncus arteriosus).
- f) Fehlende Pigmentierung der Choroidea der homozygoten Tiere.
- g) Fehlende Melanozyten in der Haut des Rückens.

#### h) Fehlende enterische Neurone des Rektums.

Dies lässt zusammenfassend feststellen, dass das Fehlen von ECE-1 die Differenzierung von vier verschiedenen Gruppen von Neuralrohrderivaten beeinflusst:

1. Kraniofaziale Strukturen aus dem zephalischen Neuralrohr.
2. Große Gefäße und die konotrunkale Region aus dem kardialen Neuralrohr.
3. Enterische Neurone aus dem vagalen Neuralrohr.
4. Epidermale und choroidale Melanozyten aus dem Neuralrohr des Stammes.

Dies zeigt die zentrale Rolle des ECE-1 in der Endothelin-Signaltransduktion der Ontogenese. Im Unterschied zu ECE-1 „Knock-out“-Mäusen sind nach Yanagisawa et al. (2000) ECE-2-defiziente Mäuse gesund und fertil. ECE-1 und ECE-2-defiziente Mäuse leiden bereits in der Embryonalentwicklung unter einer Zunahme der kardialen Fehlbildungen, vor allem am AV-Kanal.

Hofstra et al., 1999, beschrieben den Fall eines Patienten mit Morbus Hirschsprung, kardialen Defekten, kraniofazialen Fehlbildungen und einer autonomen Dysfunktion bei einer Mutation im Exon 19 des ECE-1-Gen. Dadurch war es zu einem Austausch der Aminosäure Arginin zu Cystein an Position 742 gekommen und der Annahme der Bildung einer alternativen Form der Disulfid-Brücke. Dies unterstreicht die Bedeutung des ECE-1 auch in der humanen Ontogenese.

### **Pathophysiologische Bedeutung**

#### **Vaskuläre Krankheiten**

Nach Minamino et al., 1997, kam es im Neointima-Modell nach Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis der Ratte zu einer Hochregulation der ECE-1 mRNA und Zunahme der Enzymaktivität nach Ballondilatation in den glatten Muskelzellen der Neointima. Die anhaltende Zufuhr von Phosphoramidon führt zu einer Reduktion der Ausprägung der Stenose.

Im Bereich der arteriosklerotischen Läsionen erkrankter Koronararterien des Menschen kommt es zu einer Expression von ECE-1 in Endothelzellen, VSMC und Makrophagen (Davenport und Kuc, 2000; Ihling et al., 2001).

#### **Kardiomyopathie**

Ono et al. zeigten 1999 eine ECE-1 mRNA-Hochregulation bei Mäusen mit Kardiomyopathie nach Enzephalomyokarditis-Virus-Infektion. Im Gegensatz dazu zeigten Zolk et al. 1999, dass es bei der humanen dilatativen Kardiomyopathie im linken Ventrikel keine Expressionsänderung gibt. Ergul et al. zeigten 2000 jedoch ebenfalls eine Expressionserhöhung und eine vermehrte ECE-Aktivität bei der humanen dilatativen Kardiomyopathie. Des Weiteren kommt es zu einer

erhöhten Expression von ECE-1 mRNA und einer Zunahme der ECE-Aktivität in Myozyten im linken Ventrikel bei der humanen ischämischen Kardiomyopathie (Ergul et al., 2000; Seneri et al., 2000).

### **Zentralnervensystem**

Heterozygote ECE-1 knock out-Mäuse haben eine erniedrigte ECE-Aktivität und eine Konzentrationserhöhung des zentralen  $\beta$ -Amyloids (Eckman et al., 2001 und 2003). Da angenommen wird, dass das  $\beta$ -Amyloid eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des M. Alzheimer einnimmt, könnte somit über den Eingriff in das ECE-System auch ein therapeutischer Nutzen für die Therapie des M. Alzheimer gegeben sein. Dies muss jedoch noch genauer determiniert werden

## **3.6 Grundlagen der isoformspezifischen Genexpression**

### **Allgemein:**

Es sind vier Mechanismen der Expression unterschiedlicher mRNA aus einem einzelnen Gen in der Eukaryontenzelle bekannt: alternative Promotoren, die alternative Primärtranskripte bilden (Landry et al., 2003), differenzielles Spleißen eines Primärtranskripts (Black, 2003), differenzielle Termination bzw. posttranskriptionale Prozessierung am 3'-Ende (Ayoubi und van de Ven, 1996) sowie sogenanntes RNA-editing bei dem einzelne Nukleotide aus der mRNA posttranskriptional entfernt, eingefügt oder chemisch modifiziert werden (Eisen, 1988).

### **3.6.1 Erläuterungen zu alternativen Promotoren:**

Die phänotypische Komplexität höherer Organismen wird nicht nur durch eine höhere Anzahl an Genen, sondern auch durch die Bildung unterschiedlicher Proteine durch jeweils ein Gen erreicht. Ein Mechanismus hierbei sind alternative Promotoren. Promotoren sind Träger von Strukturelementen, die die Bindung der RNA-Polymerasen an den Transkriptions-Startpunkt ermöglichen und Informationen darüber geben können, mit welcher Effizienz ein Gen transkribiert wird bzw. wie seine Transkription reguliert ist. Alternative Promotoren bilden somit Transkripte, die sich am 5'-Terminus unterscheiden. Neben ihrem Beitrag zur erhöhten phänotypischen Komplexität gibt es noch weitere Funktionen. U. a. ermöglichen sie eine unterschiedlich starke Expression (z. B. eine temporäre Genexpression in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium) und eine zellspezifische Regulation. Des Weiteren ergibt sich dadurch die Möglichkeit der Reaktion auf spezifische zelluläre und metabolische Bedingungen.

Ein gut untersuchtes Beispiel für ein humanes Gen mit gewebespezifischer Expression durch alternative Promotoren ist das *CYP19* Gen. Es kodiert für die Aromatase P450, die die Umwandlung von C<sub>19</sub>-Steroiden in C<sub>18</sub>-Östrogene katalysiert. Ein anderes Beispiel ist das *α-Amylase-Gen* mit schwachem, leberspezifischem Promotor und weiter 5' starkem speicheldrüsenpezifischem Promotor (100-fach höhere Expressionsspiegel der *α*-Amylase möglich). Auch die „Insulin-like growth factors“ (IGF) werden durch alternative Promotoren gesteuert. Das *IGF-II Gen* besitzt vier Promotoren 5' vom ersten Exon. In der Fetalentwicklung sind Promotoren zwei, drei und vier aktiv. Nach der Geburt werden diese in der Leber abgeschaltet und Promotor eins wird aktiviert. Bei dem IGF-I Gen wird Promotor eins in den meisten fetalen und adulten Geweben exprimiert. Promotor zwei ist vor allem postnatal und vor allem in der Leber aktiv, wobei lediglich Promotor zwei in der Aktivität abhängig ist von Somatotropin.

Regulation der Genexpression wird auch auf dem post-transkriptionalen Level durch Bildung alternativer mRNA's mit unterschiedlicher Stabilität oder Translationseffizienz erreicht (Schibler und Sierra, 1987; Ayoubi und van de Ven, 1996). Alternative Promotoren können jedoch auch nicht zu verschiedenen Proteinen führen, wenn die ersten Exone jeweils nicht translatiert werden (Bonham et al., 2000, Medstrand et al., 2001, Saleh et al., 2002).

### **3.6.2 Erläuterungen zu Mikrosatelliten**

Die Promotoren selbst können sich wieder interindividuell unterscheiden. Die Unterschiede kommen u.a. durch Mikrosatelliten zustande. Diese sind Teile der DNA, in denen sich Basensequenzen aufeinanderfolgend wiederholen. Diese Sequenzen sind oft hoch polymorph in der Anzahl der Wiederholungen. Es wird angenommen, dass Mikrosatelliten Basensequenzen hinzugewinnen oder verlieren können, wenn sie mutieren. Dies könnte von pathologischer Bedeutung sein (Rubinsztein et al., 1999). Solche Mikrosatelliten können u.a. aus sogenannten CpG-Inseln bestehen. CpG-Inseln sind Regionen der DNA, die länger als 200 Basenpaare sind und einen hohen Gehalt an CpG haben. Des Weiteren muß per definitionem nach Gardiner-Garden und Frommer (1987) das beobachtete/erwartete Verhältnis des Auftretens der CpG's > 0,6 sein. CpG-Dinukleotide repräsentieren die meisten Stellen für das epigenetische Phänomen der Methylierung in Säugetieren. Methylierung CpG-reicher Regionen wird bei Säugetieren zur Blockade des Transkriptionsstartes verwendet und ist u. a. für die Stilllegung der Gene auf dem inaktiven X-Chromosom zuständig (Jones u. Takai, 2001).

### 3.6.3 Isoformspezifische Genregulation des ECE-1

Es wurden multiple Transkriptionsstartpunkte 5' der damals bekannten Exone 1 (ECE-1b) und 3 (ECE-1a) detektiert (Valdenaire et al., 1995). Die funktionelle Aktivität dieser alternativen Promotorsequenzen wurde durch Reporterassays und Charakterisierung beteiligter *cis*-Elemente nachgewiesen (Orzechowski et al., 1997; Funke-Kaiser et al., 1998). Bei beiden Promotoren fehlen Inr-Elemente und TATA-Boxen sowie CAAT-Boxen (= Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die den Transkriptionskomplex mit der RNA Polymerase II bilden). Der Promotor der Isoform 1a weist funktionelle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Ets-1 an Position -638 und -658 auf (Orzechowski et al., 2001).

Innerhalb des Promotors der Isoform 1b gibt es multiple Konsensussequenzen für den Transkriptionsfaktor Sp1 in der GC-reichen Region um die Position -31 vor dem ATG in Exon 1b. Dies ist typisch für TATA-Box-lose Promotoren, denn bei ihnen spielt Sp1 eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsinitiation (Kadonaga et al., 1986; Pugh und Tjian, 1991). Gleiches gilt für den ECE-1d-Promotor. Bei ihm liegen zwischen Exon 1b und 2 zwei funktionelle Sp1-Konsensussequenzen (Valdenaire et al. 1999a).

Bezüglich des Promotors der ECE-1 Isoform c waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit der humane ECE-1c Promotor kloniert und der Nachweis funktioneller Promotoraktivität erbracht, waren die Transkriptionsstartpunkte bestimmt und eine Analyse der Konsensussequenzen für mögliche Transkriptionsfaktorbindung erfolgt (Abb. 1 und Funke-Kaiser et al., 2000). An Mikrosatelliten hatten sich drei Dinukleotid-Wiederholungen 5' gefunden [5'(CA)<sub>n</sub>, (CG)<sub>n</sub> und 3'-(CA)<sub>n</sub>].

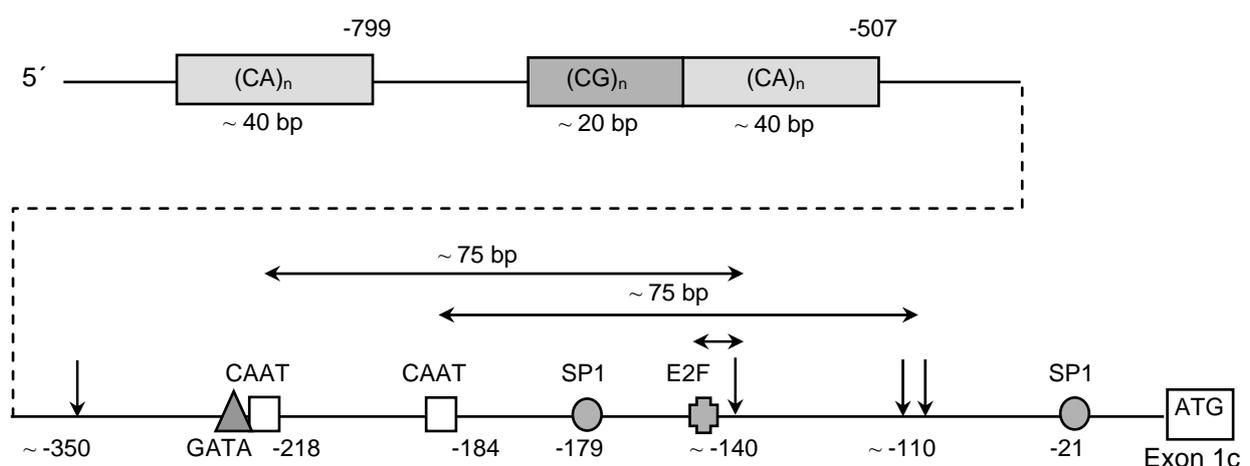


Abb. 1. Genomische Organisation des *ECE-1c* Gens. Die durchgehende bzw. gestrichelte Linie stellt die DNA des *ECE-1c* Promotors dar. Die Bindungsstellen für die verschiedenen Transkriptionsfaktoren (GATA, SP1, E2F), die CAAT-Boxen sowie die Mikrosatelliten mit den

Dinukleotidwiederholungen (CA, CG, CA) sind jeweils mit dem Basenpaarabstand (bp) vom Transkriptionsstartkodon ATG angegeben bzw. die Mikrosatelliten mit ihrer Länge.

#### 4 FRAGESTELLUNG

Humanes ECE-1 wird in vier verschiedenen Isoformen (Shimada et al., 1995b; Schmidt et al., 1994; Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999a) exprimiert, genannt ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d, die eine ähnliche Enzymkinetik, aber unterschiedliche Gewebeexpression (Valdenaire et al., 1995; Orzechowski et al., 1997) und subzelluläre Lokalisation (Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999b) aufweisen.

Diese ECE-1-Isoformen werden durch alternative Promotoren generiert, im Gegensatz zum differenziellen Spleißen eines gemeinsamen Transkripts (Valdenaire et al., 1995 u. 1999a; Orzechowski et al., 1997). Im Hinblick auf das Expressionslevel und die Gewebeverteilung ist ECE-1c offensichtlich eine Hauptisoform (Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999b; Funke-Kaiser et al., 2000). Mit diesen Vorgaben stellten sich nun folgende Fragestellungen:

1. Führt die Mutation der E2F-Konsensus Sequenz an Position –154 ähnlich wie in MCF7-Mammakarzinomzellen (Funke-Kaiser et al., 2000) zu einer Reduktion der Promotoraktivität auch in EA.hy926-Endothelzellen?
2. Welche Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie binden an das E2F-Element des ECE-1c Promotors?
3. Wird der ECE-1c Promotor auch über die SP1-Konsensusstellen an Position –21 und –179 reguliert?
4. Welche Transkriptionsfaktoren binden an der positiv regulatorischen Promotorregion zwischen –217 und –240?
5. Welche funktionellen Hinweise ergeben sich aus der mRNA-Gewebeverteilung des ECE-1c?
6. Sind die Mikrosatelliten in der „upstream“-Region polymorph?
7. Beeinflussen dann eventuelle Mikrosatellit-Polymorphismen die Transkriptionsaktivität?
8. Ist der CG-Mikrosatellit in EA.hy926-Zellen methyliert oder unmethyliert?
9. Wird die ECE-1c Promotoraktivität durch *in vitro*-Methylierung unterdrückt?
10. Ergibt sich aus den gewonnenen Ergebnissen ein Hinweis auf die Regulation des ECE-1c Promotors durch spezifische Stimuli oder ist er ein typischer „Housekeeping“-Promotor?