

6 ERGEBNISSE

6.1 E2F-2 reguliert den humanen ECE-1c Promotor

In der humanen Epithelzelllinie MCF7 führte eine Mutation der E2F-Konsensussequenz an Position -154 zu einem Abfall von 79 % der Promotoraktivität (Funke-Kaiser et al., 2000). In dieser Arbeit wurde nun die gleiche Mutation in EA.hy926-Zellen untersucht und eine Reduktion in der Reporter-Gen-Aktivität von 75 % im Vergleich zum Wildtyp gefunden (Abb. 2a). Um zu ermitteln, welche Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie an das E2F-*cis*-Element binden, führten wir einen EMSA, sowie Supershift-Assays unter Gebrauch von spezifischen Antikörpern für E2F-1, E2F-2 und E2F-3 durch. Nur die Zugabe eines Antikörpers, der spezifisch für den Transkriptionsfaktor E2F-2 ist, induzierte eine Supershiftbande. Die Antikörper gegen die anderen Mitglieder der E2F-Familie ergaben keinen Supershift (Abb. 2b). Durch die Zugabe ansteigender Mengen nichtradioaktivmarkierter Oligodesoxynukleotide ergab sich eine komplementäre Abnahme der zu sehenden verschobenen Bande. Dies gilt als Nachweis der Spezifität. Eine zweite Shiftbande mit niedrigerem molekularem Gewicht wurde weder durch Kompetitor-Oligodeoxnukleotide, noch durch E2F-Antikörper beeinflusst und galt daher als nicht-spezifisch (Abb. 2b).

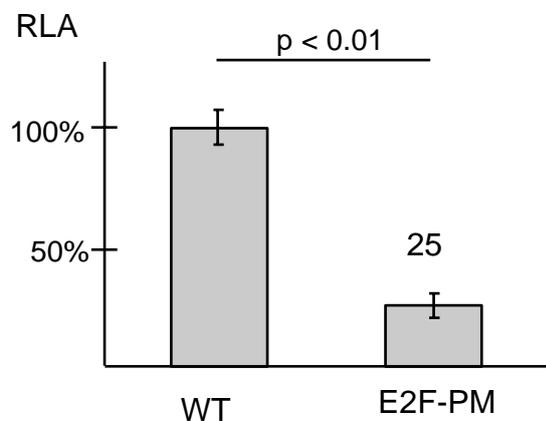


Abb. 2a: Funktionelle Analyse der E2F-Konsensussequenz bei Position -154 des ECE-1c Promotors. Vergleich der Luciferase-Reporteraktivität eines Wildtyppromotorkonstruktes (WT) mit einem entsprechenden Promotorkonstrukt, das eine an Position -154 mutierte Konsensussequenz enthält (E2F-PM): Verringerung der Promotoraktivität um 75 % durch die Mutation. Die Promotoraktivität wird durch die relative Luciferaseaktivität (RLA) ausgedrückt.

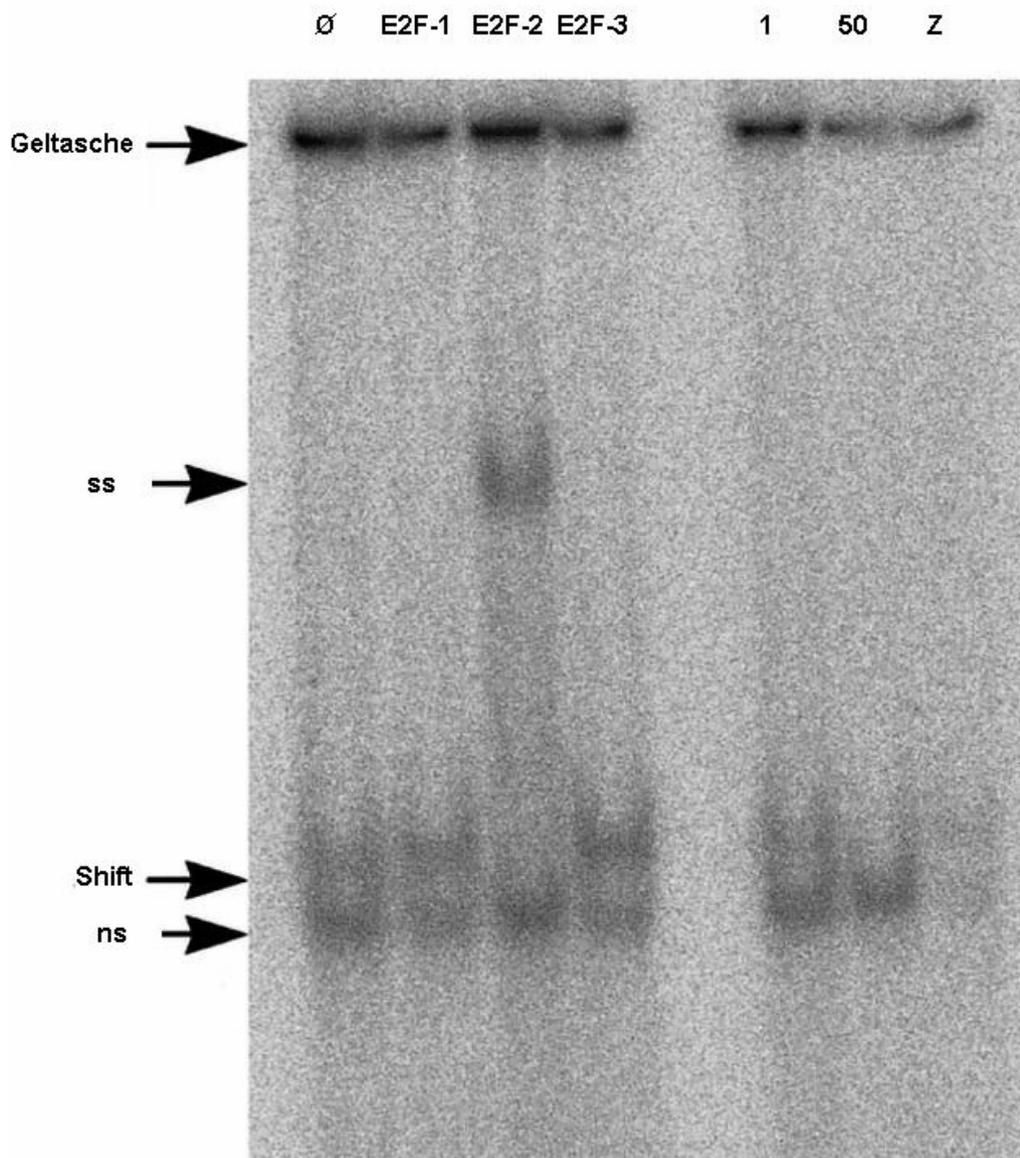


Abb. 2b: Bindung von E2F an die Konsensussequenz bei Position – 154 des humanen ECE-1c-Promotors. Der EMSA wurde mit radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotiden, die die E2F-Konsensussequenz enthalten, und Proteinen von EA.hy 926-Zellen durchgeführt: entweder ohne Antikörper und Kompetitor (\emptyset) oder mit einer Bindungsreaktion in der Anwesenheit von 6 mg des spezifischen Antikörpers (E2F-1, -2, -3). Zwei weitere Banden zeigen Konkurrenzexperimente in der Anwesenheit von 1 oder 50 pmol unmarkierter Oligodesoxynukleotide (1 bzw. 50). Der Supershift (ss) findet sich in der E2F-2-Spur. Zur Kontrolle wurde ein Lauf mit zytosolischen Proteinen durchgeführt (Z). Die am weitesten gelaufenen Banden werden als nicht spezifisch (ns) angesehen.

6.2 Regulation des ECE-1c Promotors über die SP1-Konsensusstelle an Position -179

Zwei Konsensussequenzen für die mögliche Bindung von SP1 wurden im proximalen ECE-1c Promotor identifiziert: bei Position -21 und -179 (Abb.1). Die Funktionalität dieser Stellen wurde durch zielgerichtete Mutation analysiert. Die Mutation beider Konsensussequenzen zur Bestimmung der Promotoraktivität bei völliger Ausschaltung der SP1-Bindungsstellen und als Kontrolle reduzierte die Promotoraktivität signifikant auf 44 % der Aktivität des Wildtyp-Konstruktes (Abb. 3a). Die Mutation des SP1-Konsensus bei Position -179 alleine resultierte in einem ähnlichen Effekt (Reduktion auf 48 % der Wildtyp-Aktivität, wohingegen die Elimination der SP1-Stelle bei Position -21 die Promotoraktivität nicht beeinflusste (Abb. 3a). Um zu untersuchen, ob die Endothelzelle EA.hy926 SP1 exprimiert und beide Konsensusstellen auch SP1 binden, führten wir ein EMSA-Experiment unter Benutzung zweier Oligodesoxynukleotide, die zu den SP1-Konsensussequenzen bei Position -21 und -179 korrespondieren, durch. Beide SP1-Konsensus-Oligodesoxynukleotide zeigten identische Shiftbanden (Abb. 3b) und Spezifität konnte mit der Kompetitionsfunktion nicht radioaktiv markierter Oligodesoxynukleotide nachgewiesen werden. Eine zweite geshiftete Bande (bei nukleären und zytosolischen Proteinen beobachtet) konnte nicht kompetitiert werden und wurde für nicht-spezifisch angesehen.

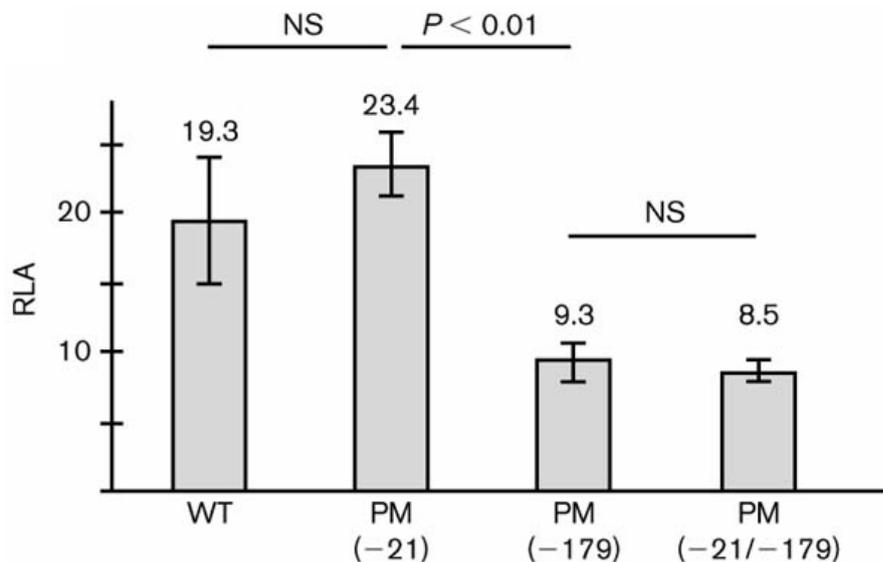


Abb. 3a: Funktionelle Analyse der SP1-Konsensussequenzen des ECE-1c Promotors. Vergleich der Luciferasereporteraktivität des ECE-1c Wildtyppromotors (WT, 968 bp) mit korrespondierenden, mutierten SP1-Konsensussequenzen bei Position (-21, -179 und -21/-179) des ECE-1c Promotors in EA.hy926-Zellen. Die Promotoraktivität wird durch die relative Luciferaseaktivität (RLA) ausgedrückt. Die Punktmutation an Position -179 verringert die RLA im Vergleich zum Wildtyp des ECE-1c Promotors ($p < 0.01$). Die zusätzliche Punktmutation an Position -21 verringert die RLA im Vergleich zur PM -179 nicht signifikant (NS).

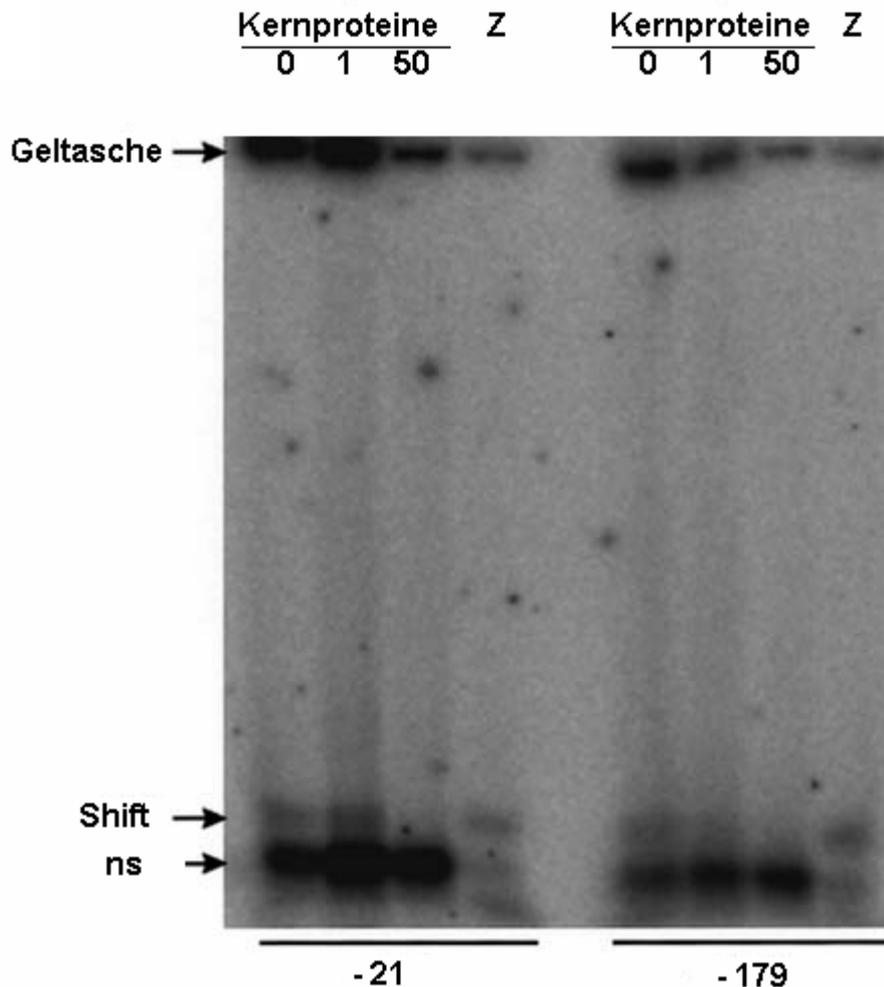


Abb. 3b: Protein-DNA-Interaktionen von Proteinen aus EA.hy926-Zellen mit SP1-Konsensus-Oligodesoxynukleotiden (ODNs), die von den Positionen -21 oder -179 des ECE-1c Promotors stammen. Die EMSA-Bindungsreaktionen wurden unter Verwendung von Kernproteinen und zytosolischen Proteinen (Z) durchgeführt. Die am weitesten gelaufenen Banden wurden für nicht spezifisch (ns) angesehen.

6.3 Die positiv regulatorische Promotorregion zwischen -217 und -240 bindet NF-YB und kann durch GATA-2 transaktiviert werden

Mit Reporter-gen-Assays mit einer Reihe von Deletionsmutanten wurde bereits ein positiv regulatorisches Promotorelement zwischen Position -217 und -240 identifiziert (Funke-Kaiser et al., 2000). Wir haben jetzt die Funktionalität dieser Region in humanen Endothelzellen bestätigt: es ergab sich ein 2,3-facher Anstieg der Aktivität des Konstruktes bis Position -240 im Vergleich zu dem Konstrukt bis Position -217 (Abb. 4). Da diese Promotorregion eine CAAT-Box enthält, die eine GATA-Konsensussequenz überlappt (Abb. 1), analysierten wir mögliche Protein-DNA-Interaktionen durch EMSA. Mittels Kernproteinen aus EA.hy926-Zellen und anwachsender Menge von nicht radioaktiv markierten Oligodesoxynukleotiden identifizierten wir eine spezifische Shiftbande, die nicht bei zytosolischen Proteinen beobachtet wurde (Abb.

5a). Eine zweite Shiftbande, die nicht durch Kompetitor-Oligodesoxynukleotide beeinflusst wurde, wurde für nicht spezifisch angesehen. Um den bindenden Transkriptionsfaktor zu identifizieren, gaben wir Antikörper, die spezifisch für das CAAT-Box bindende Protein NF-YB und für GATA-2 waren, hinzu. Die Zugabe von NF-YB (auch CBF-A) Antikörper resultierte in einer Supershift-Bande, die mit dem kompletten Verschwinden der geshifteten Bande einherging. Somit wurde Bindung von NF-YB an das *cis*-Element zwischen Position -217 und -240 gezeigt.

Um zu untersuchen, ob GATA-2 das Potenzial zur Transaktivierung des ECE-1c Promotors hat, führten wir GATA-2-Co-Expressions-Experimente mit den ECE-1c Promotorkonstrukten -217 und -240 durch. Ohne Zugabe von GATA-2 ergab sich bereits ein 2.3-facher Anstieg der Promotoraktivität zwischen dem Promotorkonstrukt -217 und dem -240 (Kontrollversuch). Bei GATA-2-Koexpression steigerte sich dieser Anstieg auf das 3.9-Fache, wobei die Kotransfektion von GATA-2 die Promotoraktivität des Promotorkonstruktes -217 nicht signifikant beeinflusste (RLA 0,63, verglichen mit 0,54 für den negativen Kontrollversuch) und GATA-2 die Promotoraktivität des Konstruktes -240 nahezu verdoppelte (Abb.4).

**Standardisierte
Luciferaseaktivität
Luc/Gal**

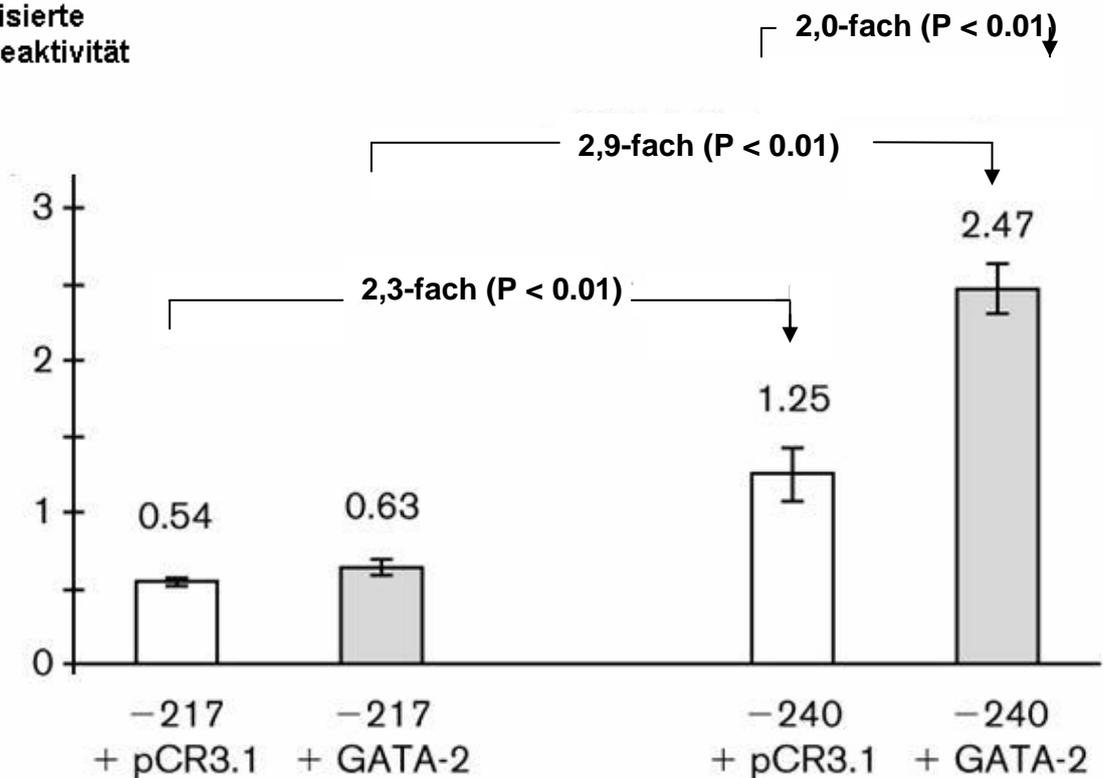


Abb. 4: GATA-2-Transaktivierung des ECE-1c Promotors. Kotransfektion des ECE-1c Promotorluciferasekonstruktes -217 (ihm fehlt die GATA-Konsensussequenz) und -240 in EA.hy926-Zellen entweder mit einem insertlosen Vektor (pCR3.1) oder mit einem Vektor, der GATA-2 exprimiert. Luc = Luciferase, Gal = Galaktosidase.

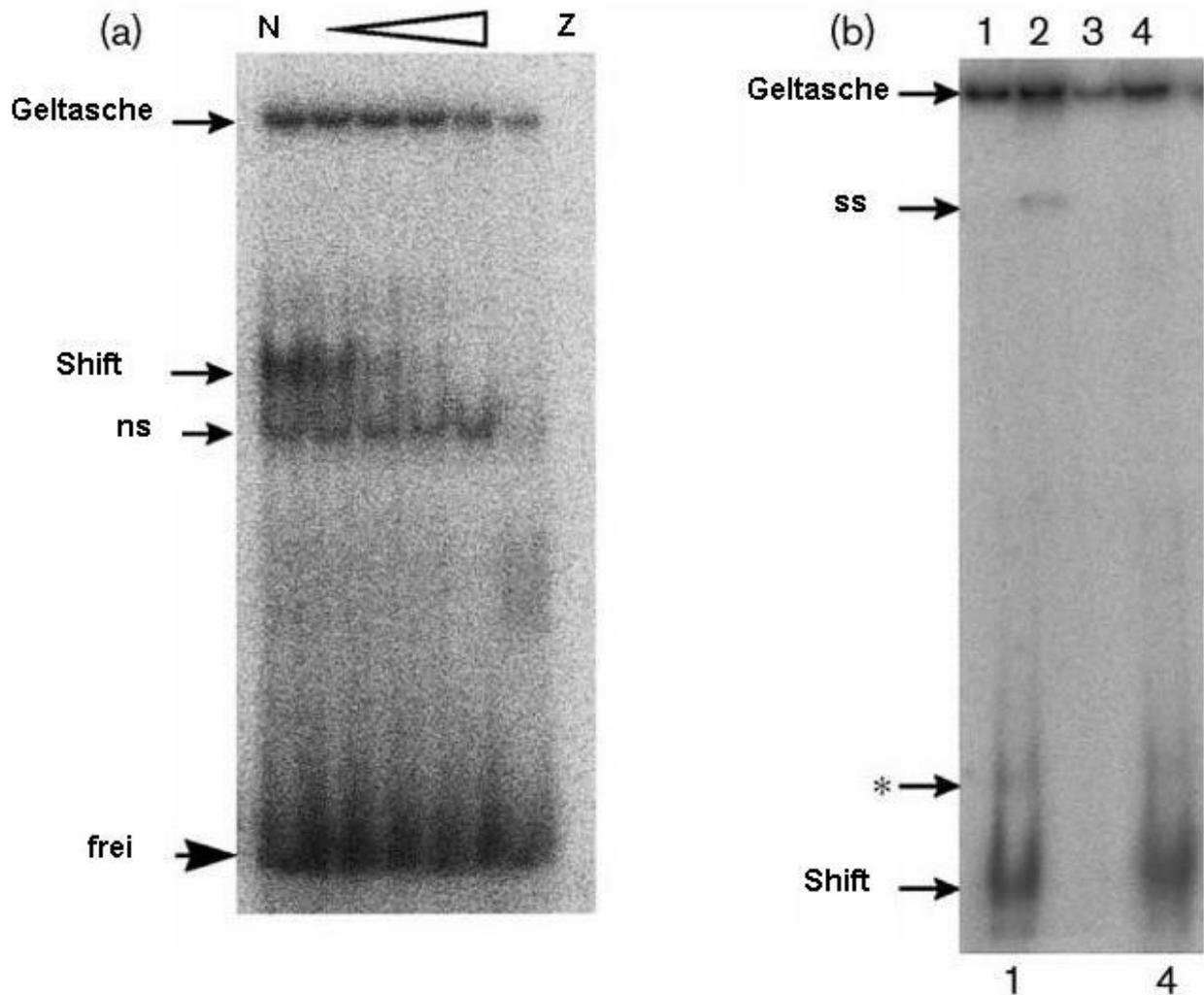


Abb. 5: Protein-DNA-Interaktionen der ECE-1c Promotorregionen -217/-240 in EA.hy926-Zellen. (a) EMSA: die Bindungsreaktionen wurden entweder mit Kernproteinen (N) oder zytosolischen Proteinen (Z) und radioaktiv markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Konkurrenzexperimente beinhalteten eine ansteigende Menge von nicht radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Die Banden unterhalb des Shiftes werden als nicht spezifisch angesehen (ns). (b) Supershiftanalyse der Kernproteine mit Anti-GATA-2 Antikörper (Spur 1), mit Anti-NF-YB Antikörper (Lauf 2), mit Kompetitor (Lauf 3), oder ohne Antikörper (Lauf 4). Der Supershift (ss) wird in Lauf 2 gesehen. Die geringen Banden über den Shifts (*) werden als unspezifisch angesehen.

6.4 ECE-1c mRNA-Expressionsanalyse

Einige Charakteristika des ECE-1c 5'-Promotors wie z.B. multiple Transkriptionsstartpunkte und funktionelle SP1-Konsensussequenzen wurden mit sog. „Housekeeping“-Promotoren assoziiert. Deshalb wurde die ECE-1c mRNA-Expression zusätzlich zu den bisher durchgeführten Experimenten (Funke-Kaiser et al., 2000) untersucht. Mittels RPA (Abb. 6a) oder RT-PCR (Abb. 6b) wurden ECE-1c-Transkripte in jeder untersuchten Zellart und in jedem untersuchten Gewebe identifiziert.

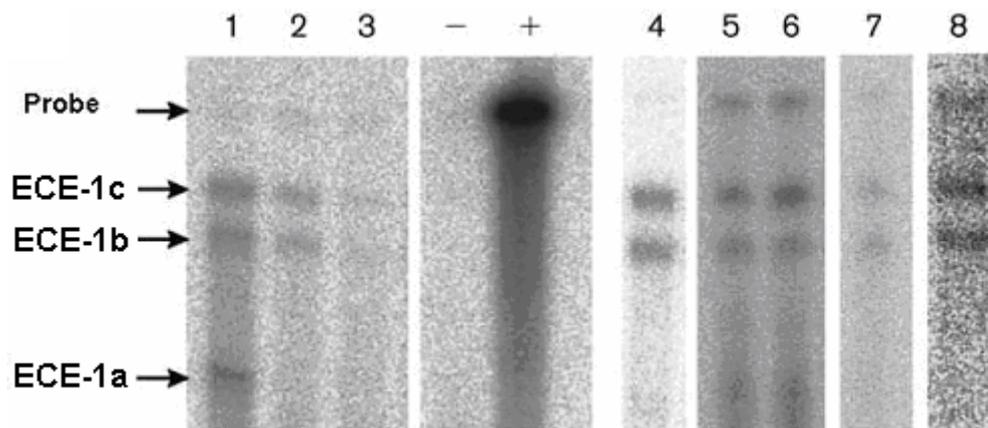


Abb. 6a: Expression von ECE-1 mRNA. (a) Expression von ECE-1a, -b und -c mRNA's bestimmt mittels RNase Protection Assay. Die gesamte RNA wurde mit einer ECE-1c „Antisense“ RNA-Probe (Gesamtlänge 400 nt) hybridisiert. Die geschützte Länge von 302 nt korrespondiert mit dem ECE-1c, wohingegen ECE-1b und ECE-1a durch die Banden mit der Länge von 264 und 177 nt repräsentiert werden. Spur 1: humane Endothelzellen aus Nabelschnurgewebe; Spur 2: HaCaT; Spur 3: KELLY; Spur 4: EA.hy926; Spur 5: humanes adultes Herzgewebe; Spur 6: humanes fetales Herzgewebe; Spur 7: humanes Lungengewebe; Spur 8: humane glatte Muskelzellen aus Nabelschnurvenen. -/+ = Hefe RNA ohne/mit RNase als Kontrollreaktion.

Zelllinie	Herkunftsgewebe	RT/PCR	
		RT+	RT-
KELLY	Humanes Neuroblastom		
SK-N-MC	Humanes Neuroblastom		
U-373_MG	Humanes Astrozytom-Glioblastom		
U-937	Humanes Histiocytenlymphom		
HL-60	Humane akut myeloische Leukämie		

Abb. 6b: Elektrophorese der reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) mit ECE-1c spezifischen „Primern“ („Sense“: 5'-GGAGCTGCGCGAAGCCGGGG-3');

„Antisense“: 5'-TTCGAGGAGGTGCTTGAT-3') und cDNA von den aufgeführten Zelllinien als Vorlage. RT+ = RT-PCR; RT- = negative Kontrolle ohne Zugabe von reverser Transkriptase.

6.5 Analyse der Mikrosatelliten der ECE-1c „upstream“-Promotorregion

Um zu untersuchen, ob die drei Mikrosatelliten, die in der „upstream“-Region des humanen ECE-1c liegen, polymorph sind, wurde eine radioaktiv markierte, genomische PCR mit einem „Primer“-paar, das alle drei Wiederholungsstrukturen (5'-CA Wiederholung, CG-Wiederholung und unmittelbar angrenzend eine 3'-CA-Wiederholung) umspannt, durchgeführt.

Gelelektrophorese der markierten Amplifikationsprodukte ergab einen hohen Grad an Polymorphismus und erlaubte die Identifikation von offensichtlich homozygoten (Nr. 2, 3, 4, 8 und 10) und heterozygoten (Nr. 1, 5, 6, 7, 9 und 11) Individuen (Abb. 7).

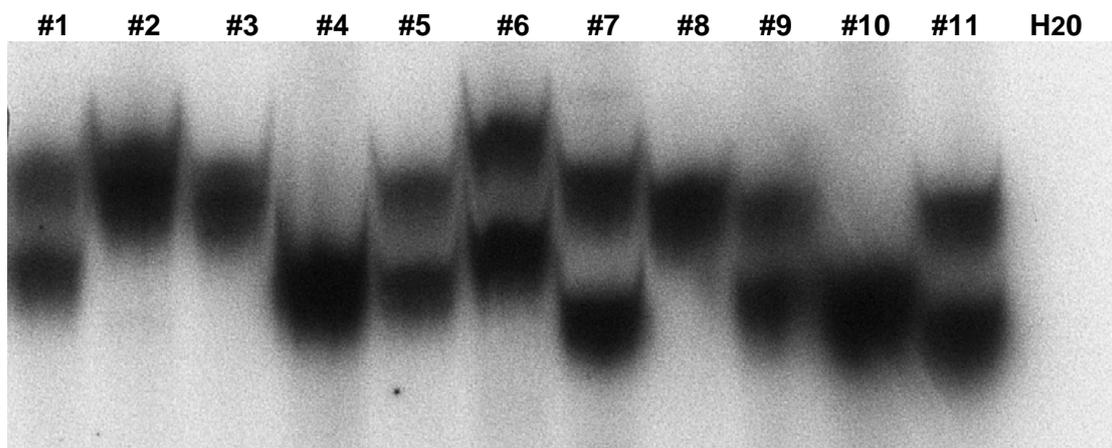


Abb. 7: Der humane ECE-1c Promotorpolymorphismus. Ergebnis einer radioaktiv markierten PCR mit einem „Primer“, der die 5'CA- und die 3'CA-Wiederholung umfasst bei DNA-Proben von elf Individuen. Die Reaktionsprodukte wurden durch Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Um zu klären, ob alle drei Mikrosatelliten polymorph sind, wurde die gleiche PCR mit sog. „proofreading“ Taq-DNA-Polymerase und DNA der homozygoten Individuen als Matrize durchgeführt. Direkte Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte, daß alle drei Mikrosatelliten-Wiederholungen hochpolymorph sind (Tabelle 1, linke Säule).

Donor-Nr.	Genomische Pfu-PCR und direkte Sequenzierung der PCR-Produkte 5'-(CA) _n -(CG) _n -(CA) _n -3'(nt)	Gesamtdinukleotid-Wiederholungen (nt)	ECE-1c Promotor subkloniert in pGL3basic 5'-(CA) _n -(CG) _n -(CA) _n -3'(nt)	Beobachtete Haplotypen nach Pfu-PCR und Subklonierung in pCRII 5'-(CA) _n -(CG) _n -(CA) _n -3'-(nt)
1	-	-	36-16-38	-
2	40 · (20-24) · (42-46)	102-110	38-22-40	-
3	36 · (22-26) · (42-46)	100-108	36-22-36	-
4	36 · (16-20) · (34-36)	86-92	32-18-36	-
5	-	-	-	36-0-38; 32-18-38; 38-18-36; 40-18-40; 40-22-36; 38-22-36
6	-	-	-	32-20-36; 32-18-36; 32-14-46; 38-20-36; 38-12-44
7	-	-	-	42-16-32; 38-22-34
8	40 · (20-24) · (38-42)	98-106	38-20-42	-
9	-	-	-	32-0-44; 40-22-40
10	38 · (18-22) · (30-34)	86-94	38-18-34	-
11	-	-	-	36-18-32

Tabelle 1: Analyse der Mikrosatelliten-Region des humanen ECE-1c Promotors. Die Länge der CA- und CG-Dinukleotidwiederholungen (nt steht für Nukleotid, n für eine unbestimmte Zahl an Dinukleotidwiederholungen) in der distalen Promotorregion wurde durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten und durch die Sequenzierung von korrespondierenden subklonierten Promotorfragmenten erhalten. Stehen die Zahlen in Klammern ergaben sich schwankende Anzahlen der angegebenen Dinukleotidwiederholungen.

Darüberhinaus bekräftigten die Sequenzierungsdaten die Ergebnisse der radioaktiven PCR mit Einbeziehung der Länge von allen drei Mikrosatelliten. Z.B. wies das Individuum Nr. 2 eine gesamte Mikrosatelliten-Wiederholungslänge von 102 bis 110 bp Länge auf (Tabelle 1), übereinstimmend mit einem langen PCR-Fragment in dem Polyacrylamidgel oder zwei fast gleichlangen Allelen (Abb. 7). Im Gegensatz dazu zeigte das Individuum mit der Nr. 10 eine gesamte Mikrosatelliten-Wiederholungslänge von 86 – 94 bp, korrespondierend mit einem kürzeren PCR-Fragment oder zwei fast gleichlangen Allelen. Die beobachtete Variabilität in der Länge der Wiederholungen, die durch die direkte Sequenzierung erhalten wurde (Tabelle 1), könnte einerseits an einem Amplifizierungsartefakt, das als „PCR-Gleiten“ bekannt ist, liegen (Artikel: Murray et al., 1993; Walsh et al., 1996), andererseits aber auch das Ergebnis von zwei fast gleichlangen Allelen sein. Zwei fast gleichlange Allele könnten allerdings auch Heterozygotie bedeuten, was zu diskutieren ist. Die PCR-Produkte, die von heterozygoten Individuen erhalten wurden, mussten vor dem Sequenzieren subkloniert werden. Diese Prozedur resultierte in mehr als den zwei erwarteten Allelen, am wahrscheinlichsten wegen einem insuffizienten bakteriellen Korrekturlesen (Tabelle 1, rechte Säule). Ein Sequenzierungsartefakt wurde nach wiederholtem Sequenzieren des subklonierten Promotorfragments ausgeschlossen.

6.6 Mikrosatelliten-Polymorphismen in dem ECE-1c Promotor beeinflussen die Transkriptionsaktivität

Dann wurde untersucht, ob die Mikrosatelliten-Polymorphismen die Promotoraktivität *in vitro* modulieren. Zur Vereinfachung wurde der ECE-1c Promotor der möglicherweise homozygoten Individuen (Nr. 2, 3, 4, 8 und 10) in ein Luciferase-Reporterplasmid subkloniert. Unter der großen Anzahl der transformierten Plasmide, die durch Sequenzierung analysiert wurden, wurden die mit einer Wiederholungslänge, die der Länge, die durch die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte erhalten wurde (Tabelle 1, mittlere Säule), am nächsten kam, in endotheliale EA.hy926-Zellen transfiziert. Es konnte gezeigt werden, daß die polymorphen Mikrosatelliten stark die Promotoraktivität beeinflussen. Zum Beispiel zeigte ein allelspezifisches Konstrukt des Individuums Nr. 4 eine 2,7-fach höhere Luciferaseaktivität verglichen mit Individuum Nr. 2 (Abb. 8). Diese Ergebnisse wurden durch zwei Wiederholungen bestätigt, die ein fast identisches Aktivitätsmuster zeigten. Darüberhinaus wurde ein ähnlicher Effekt der Mikrosatellitpolymorphismen auf die Promotoraktivität auch in neuronalen KELLY-Zellen beobachtet (Abb. 8).

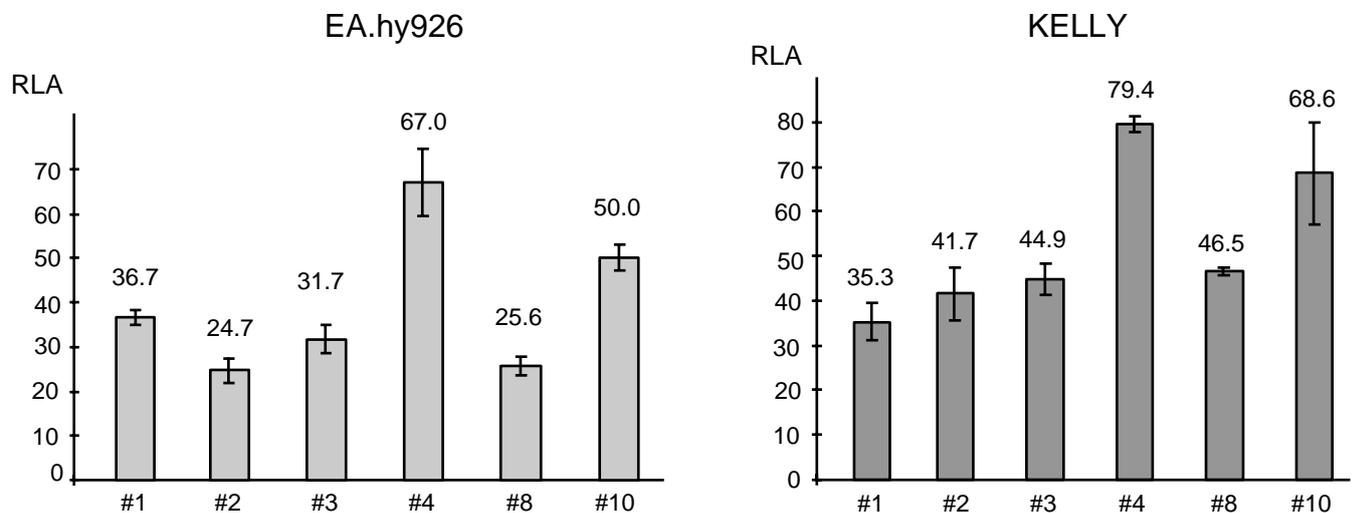


Abb. 8: Der humane ECE-1c Mikrosatelliten-Promotorpolymorphismus beeinflusst die Promotoraktivität *in vitro*. Humane, polymorphe, genomische DNA diente als Vorlage für die Generierung von Luciferasekonstrukten der Länge 986bp des ECE-1c Promotors mit unterschiedlichen Allelen. Die Promotorkonstrukte wurden in endotheliale EA.hy926-Zellen und in neuronale KELLY-Zellen transfiziert. Die Promotoraktivität wird durch die relative Luciferaseaktivität (RLA in %) ausgedrückt. Die Nummern 1, 2, 3, 4, 8 und 10 korrespondieren zu den Nummern in der Tabelle 1.

6.7 Der CG-Mikrosatellit ist in genomischer DNA nicht methyliert

Der Methylierungsstatus der CG-Dinukleotid-Wiederholung wurde in genomischer DNA von EA.hy926-Zellen mit der Bisulfit-Modifizierungsmethode untersucht. Die spezifische Bindung der PCR-„Primer“ an Natrium-Bisulfit-modifizierte DNA wird in Abb. 9 gezeigt. Die Sequenzierung dieses 212 bp langen PCR-Produkts (Spur 1), das die CG-Mikrosatellit-Wiederholung umspannt, zeigte, daß zumindest 8 von 9 CG-Dinukleotiden in dem Mikrosatelliten zu TG-Dinukleotiden durch Bisulfit-Behandlung umgewandelt wurden. Dies weist auf den unmethylierten Status in nativer genomischer DNA von EA.hy926-Zellen hin.

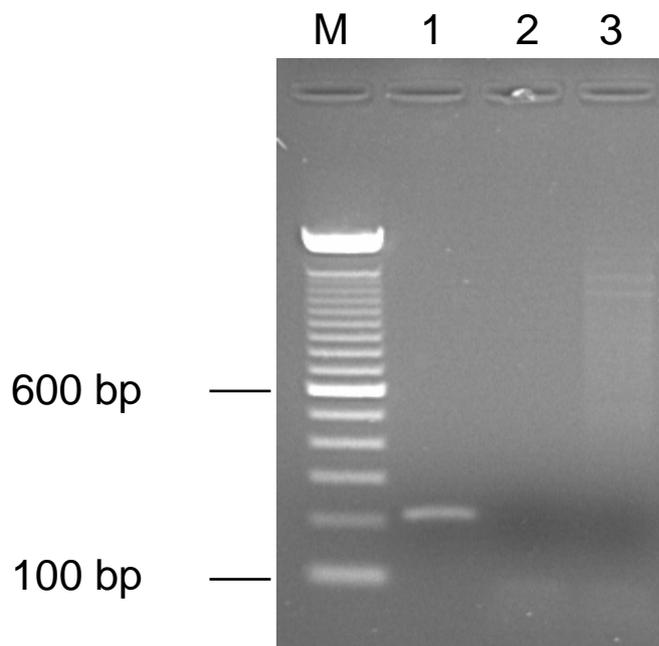


Abb. 9: Genomische PCR zur Kontrolle der DNA-Modifizierung durch Natriumbisulfit. Die genomische DNA wurde aus EA.hy926-Zellen extrahiert und einer Bisulfitmodifizierung, einer PCR-Amplifizierung und nachfolgender Agarosegelelektrophorese unterzogen. Die PCR-„Primer“ sind spezifisch für durch Natriumbisulfit modifizierte DNA und korrespondieren mit dem PCR-Produkt des ECE-1c Promotors von 212bp Länge, das den 5'-CG-Mikrosatelliten einschließt. Lauf M: 100bp-Leiter. Lauf 1: durch Bisulfit modifizierte DNA-Agarose-Bande. Lauf 2: Kontrolle (H₂O). Lauf 3: unmodifizierte genomische DNA als Kontrolle.

6.8 ECE-1c Promotoraktivität wird durch *in vitro*-Methylierung unterdrückt

Eine Reihe von Deletionsmutanten des ECE-1c Promotor-Reporterkonstrukts wurde in EA.hy926-Zellen transfiziert, entweder *in vitro* methyliert oder als nicht-methylierte native DNA (Abb. 10). Die nativen Plasmide wurden einer Schein-Methylierung vor der Transfektion unterzogen und dienten als Kontrolle. Die Methylierung unterdrückte die Promotoraktivität von allen Deletionsmutanten, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Zum Beispiel wurde das

Konstrukt -409 6,5-fach unterdrückt, das Promotorkonstrukt -968 hingegen, das die CG-Wiederholung enthält, zeigte eine stärkere Unterdrückung durch Methylierung (17-fach) (Abb. 10). Interessanterweise, und im Gegensatz zu den unmethylierten analogen Konstrukten, war das methylierte Konstrukt -968 signifikant ($P < 0,05$) weniger aktiv als das methylierte Konstrukt -409. Dies legt eine Methylierung-sensitive, negativ regulatorische Region nahe.

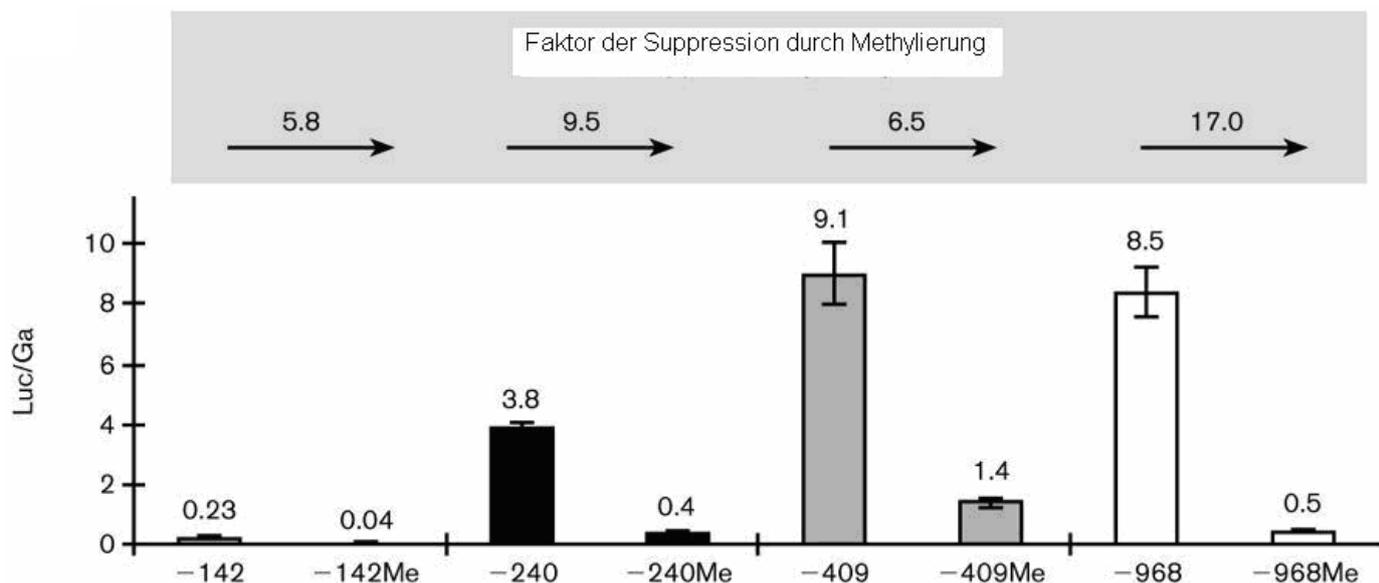


Abb. 10: Analyse der Effekte der Methylierung auf die Funktion des ECE-1c Promotors. Effekt der *in vitro*-Methylierung des gesamten ECE-1c Promotor/Luciferasekonstruktes (bzw. mehrerer Deletionsmutanten) auf die Reporteraktivität. Humane ECE-1c Promotor-Reporterplasmide wurden einer *in vitro*-Methylierung (Me) oder Scheinmethylierung unterzogen, gefolgt von Transfektion in EA.hy926-Zellen. Luc = Luciferase; Ga = Galaktosidase.

Um zu untersuchen, ob die CG-CA Mikrosatelliten für diesen Effekt verantwortlich waren, wurden zwei Promotor-Deletions-Mutanten, -586 (mit der CG-CA-Wiederholung) und -512 (ohne die CG-CA-Wiederholung), subkloniert und die Promotoraktivität der *in vitro*-methylierten Konstrukte in EA.hy926-Zellen analysiert (Abb. 11). *In vitro*-Methylierung resultierte in einem ähnlichen relativen Abfall der Promotoraktivität, was offenkundig unabhängig von Anwesenheit der CG-CA-Wiederholung (Konstrukt -586: 31,8 % der nichtmethylierten Kontrolle; Konstrukt -512: 36,8 % der nichtmethylierten Kontrolle) war. Dieses Ergebnis, das in einem zweiten Versuch reproduziert wurde, macht unwahrscheinlich,

dass die polymorphe CG-Wiederholung in die Methylierungs-induzierte Herabregulierung der ECE-1c Promotoraktivität involviert ist.

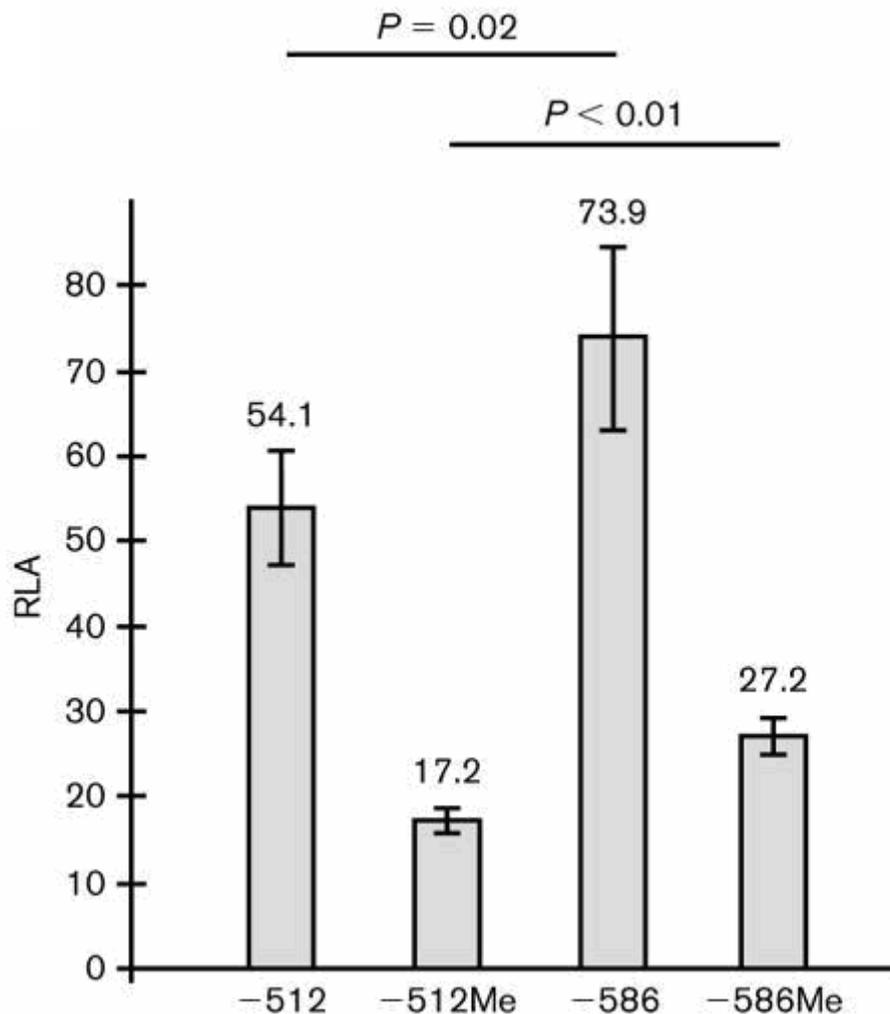


Abb. 11: Effekt der Methylierung (Me) der CG-CA-Mikrosatelliten auf die ECE-1c-Promotorfunktion. Die Reporterkonstrukte -512 und -586 wurden wie oben beschrieben methyliert und in EA.hy926-Zellen analysiert. RLA = relative Luciferaseaktivität.

Um die Möglichkeit auszuschliessen, daß die Methylierung des Reportervektor-Grundgerüsts für die Unterdrückung durch Methylierung verantwortlich ist, wurde eine „Patch“-Methylierung der Promotordeletionsmutante -490, die bereits eine maximale Promotoraktivität besitzt, durchgeführt. Die „Patch“-Methylierung des ECE-1c Promotors bis zur Position -490 wurde durch Methylierung und Scheinmethylierung der isolierten Promotorfragmente *in vitro* erreicht, gefolgt von einer Religation mit dem nativen Reportervektor-Grundgerüst. Nach der Aufreinigung wurde das Bindungsprodukt sofort in EA.hy926-Zellen transfiziert, ohne vorherige

bakterielle Transformation. In EA.hy926-Zellen resultierte die „Patch“-Methylierung des ECE-1c Promotorfragments in einer stark reduzierten Promotoraktivität (8,6 % des scheinmethylierten Promotorfragments; Abb. 12).

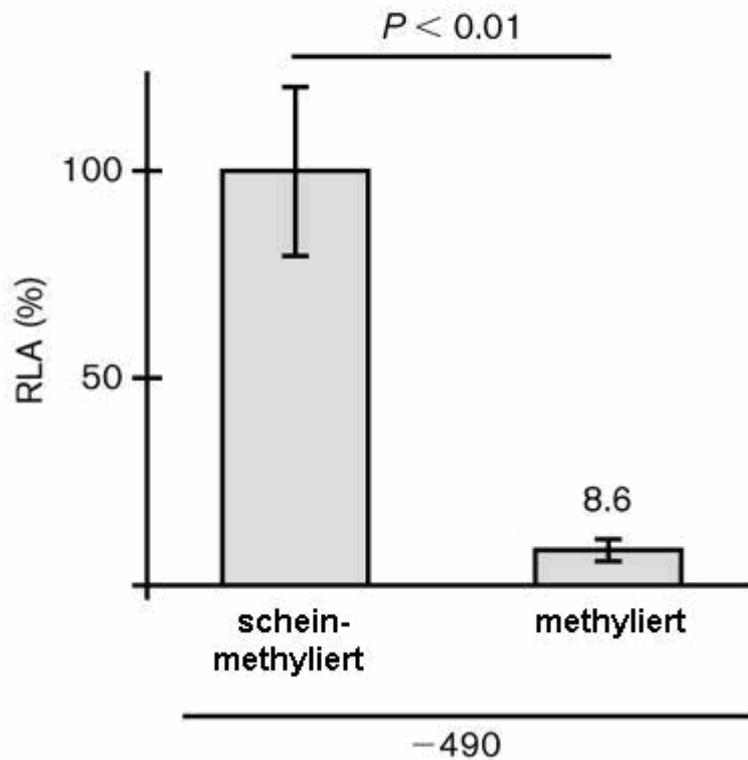


Abb. 12: Effekt der „Patch“-Methylierung auf die ECE-1c Promotoraktivität. Ein Luciferasereporterkonstrukt, das 490bp des humanen ECE-1c Promotors enthält, wurde einer Methylierung unterzogen und in EA.hy926-Zellen transfiziert. Die RLA des scheinmethylierten Konstrukts, das dieselbe Dau-Religationsprozedur durchlief, wurde gleich 100 % gesetzt.