

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**Expression und Funktion
Endothelin-Konvertierungsenzym-1
regulierender Transkriptionsfaktoren in
humanen neuroepithelialen und meningealen Tumoren**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Bremer

aus Berlin

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski
 2.: Prof. Dr. med. F. Heppner
 3.: Prof. Dr. med. G. Schönfelder

Datum der Promotion: 30.01.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1 DANKSAGUNG	6
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
3 EINLEITUNG	9
3.1 Tumoren des Nervensystems	9
3.1.1 Gliale Tumoren des Nervensystems	9
3.1.1.1 Einteilung glialer Tumoren	9
3.1.1.2 Lokalisation, Alters- und Geschlechtsverteilung glialer Tumoren.....	10
3.1.1.3 Histopathologie astrozytärer Tumoren	10
3.1.1.4 Molekulare Pathologie astrozytärer Tumoren.....	10
3.1.1.5 Prognose glialer Tumoren	11
3.1.2 Neuroblastäre Tumoren	12
3.1.3 Meningeale Tumoren	12
3.2 Das Endothelinsystem	13
3.2.1 Biosynthese der Endotheline	13
3.2.2 Expression der Endotheline	13
3.2.3 Funktionelle Bedeutung des Endothelinsystems	14
3.2.4 Die Rolle des Endothelinsystem bei Tumorerkrankungen	14
3.2.4.1 Expression des Endothelinsystems in extrakraniellen Tumoren.....	15
3.2.4.2 Expression des Endothelinsystems in Gehirn und intrakraniellen Tumoren	15
3.2.4.3 Endothelin als Mitogen	16
3.2.4.4 Endothelin und Apoptose.....	17
3.2.4.5 Endothelin und Angiogenese.....	18
3.2.4.6 Endothelin und Tumorerkrankungen	18
3.2.5 Endothelin-Konvertierungsenzym (ECE)	18
3.2.5.1 Funktionelle Bedeutung von ECE-1 als therapeutische Zielstruktur	19
3.2.5.2 Isoformen von ECE-1	19
3.2.5.3 Der ECE-1c Promotor.....	20
3.2.5.4 Der ECE-1b Promotor.....	21
3.3 Transkriptionsfaktoren	22
3.3.1 E2F-Familie	22
3.3.1.1 Funktion der E2F-Familienmitglieder.....	22
3.3.1.2 Einteilung und Regulation der E2F-Familienmitglieder	23
3.3.2 GATA-Familie.....	25
3.3.3 CCAAT <i>binding factor</i> (CBF).....	26
4 FRAGESTELLUNG	28
5 MATERIAL UND METHODEN	29
5.1 Zellkultur	29
5.1.1 Verwendete Zelllinien und Medien.....	29
5.2 Gewebe	29
5.3 Extraktion und Konzentrierung von Gesamtprotein.....	30
5.4 Extraktion zytosolischer und nukleärer Proteine	30
5.4.1 Prinzip	30

5.4.2 Lösungen für die Extraktion zytosolischer und nukleärer Proteine.....	30
5.4.3 Durchführung	30
5.5 Membranprotein-Extraktion aus Zellen.....	31
5.5.1 Prinzip	31
5.5.2 Lösungen für die Membranprotein-Extraktion.....	31
5.5.3 Durchführung	31
5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	32
5.7 Western Blot	32
5.7.1 Prinzip	32
5.7.2 Lösungen für den Western Blot	33
5.7.3 Durchführung	33
5.7.3.1 Vorbereitungen	33
5.7.3.2 Elektrophoretische Auftrennung	34
5.7.3.3 Blot Transfer	34
5.7.3.4 Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau S.....	35
5.7.3.5 Blockierung unspezifischer Bindungen.....	35
5.7.3.6 Waschen.....	35
5.7.3.7 Inkubation mit dem Primärantikörper.....	35
5.7.3.8 Inkubation mit dem Sekundärantikörper.....	36
5.7.3.9 Detektionsreaktion	36
5.7.3.10 Detektion von β -Aktin.....	36
5.7.3.11 Spezifitätskontrolle des Anti-E2F-2 Antikörpers mit <i>Blocking Peptide</i>	36
5.7.3.12 Bestimmung der relativen ECE-1 Expression	37
5.8 Immunzytologie	37
5.8.1 Prinzip	37
5.8.2 Durchführung	37
5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	38
5.9.1 Prinzip	38
5.9.2 Lösungen für den EMSA.....	38
5.9.3 Durchführung	39
5.9.3.1 Vorbereitungen	39
5.9.3.2 Kinasierungsreaktion	40
5.9.3.3 Bindungsreaktion und Gellauf	40
5.10 Southwestern Blot.....	40
5.10.1 Prinzip	40
5.10.2 Lösung für den Southwestern Blot.....	41
5.10.3 Durchführung	41
5.11 Reporteragen Assay.....	41
5.11.1 Prinzip	41
5.11.2 Reporteragenkonstrukte.....	42
5.11.3 Klonierung von Expressionsvektoren für E2F-1 und E2F-2.....	42
5.11.4 Transiente Transfektion	43
5.11.4.1 Prinzip	43
5.11.4.2 Durchführung	43
5.11.5 Bestimmung der Luziferaseaktivität und Berechnung der relativen Luziferaseaktivität	44
5.12 Reagenzien, Geräten und Materialien	44
6 ERGEBNISSE	48
6.1 Identifizierung funktioneller Elemente in den ECE-1 Promotoren	48
6.1.1 E2F-2 interagiert mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor	48

6.1.2 Protein-DNA-Interaktionen im ECE-1c Promotor.....	49
6.1.2.1 E2F-2 interagiert mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor	49
6.1.2.2 Untersuchung der CCAAT-Box im ECE-1c Promotor	52
6.1.3 Unterschiede in der Affinität von E2F-2 zum ECE-1b und -1c Promotor.....	53
6.2 Funktionalität der E2F-Bindungsstelle im ECE-1c Promotor	55
6.2.1 Promotorfunktionsanalyse mittels Reportergen Assay	55
6.2.2 Datenbankanalyse zur Bestimmung von Bindungsmotiven.....	56
6.2.3 Auswirkungen der Mutation auf die E2F-2 Bindungsaffinität im EMSA.....	56
6.3 Proteinexpression von Transkriptionsfaktoren	57
6.3.1 Expression von E2F in Hirntumoren und Zelllinien.....	57
6.3.1.1 Expression von E2F in Hirntumoren.....	57
6.3.1.2 Expression von E2F in Zelllinien	61
6.3.2 Expression von GATA-2 und GATA-3 in Hirntumoren und Zelllinien	63
6.3.3 Expression von CBF-A in Hirntumoren und Zelllinien.....	64
6.4 Proteinexpression von ECE-1 in Hirntumoren und Zelllinien.....	65
6.4.1 Expression von ECE-1 in Hirntumoren	65
6.4.2 Vergleich der Expression von ECE-1 mit der von E2F-2 Varianten	65
6.4.3 Expression von ECE-1 in Zelllinien.....	67
7 DISKUSSION	68
7.1 Spezifische Interaktion von E2F-2 mit ECE-1 Promotoren	68
7.1.1 Spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor	68
7.1.2 Spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor	69
7.1.3 Individuelle Funktion einzelner E2F-Familienmitglieder	71
7.1.4 Funktionelle Bedeutung des E2F-Bindungsmotivs für die ECE-1c Promotoraktivität	72
7.1.5 Bindung von putativen E2F-2 Varianten an den ECE-1c Promotor.....	74
7.1.6 Extraktion von Kernproteinen.....	75
7.2 ECE-1 als mögliches Zielgen einer alterierten Rb-Signaltransduktion	76
7.3 Spezifische Interaktion von CBF mit seinem Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor	77
7.4 Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren	78
7.4.1 Probenmaterial.....	78
7.4.2 Expression von E2F-1 in Hirntumoren und Zelllinien.....	79
7.4.2.1 Expression von E2F-1 Varianten in humanen intrazerebralen Tumoren	79
7.4.2.2 Posttranslationale Modifikationen als mögliche Erklärung der E2F-1 Varianten.....	80
7.4.3 E2F-3 Expression in intrakraniellen Tumoren und Zelllinien	81
7.4.3.1 E2F-3 Expression in Hirntumoren	81
7.4.3.2 Defiziente Expression von E2F-3 in höhergradigen Astrozytomen.....	81
7.4.4 Korrelation der Expression verschiedener E2F-Familienmitglieder.....	82
7.4.5 Proteinexpression von GATA-2 und GATA-3	83
7.5 Therapeutische Implikationen.....	83
7.5.1 Endothelinsystem als therapeutisches Target bei Tumorerkrankungen.....	83
7.5.2 ECE als therapeutische Zielstruktur.....	84
7.5.3 Therapeutische Modulation von E2F-2 und CBF in Hirntumoren	84
8 ZUSAMMENFASSUNG	86
9 LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONEN	89
10 LITERATURVERZEICHNIS	91

1 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Heiko Funke-Kaiser für die gründliche Betreuung während der praktischen Zeit dieser Arbeit und die zahlreichen intensiven wissenschaftlichen Diskussionen. Diese haben mir nicht nur bei der Durchführung dieser Arbeit wichtige Dienste erwiesen, sondern außerdem die Begeisterung an Wissenschaft und Forschung in mir geweckt und damit entscheidend die Planung meiner beruflichen Zukunft beeinflusst.

Herrn Privatdozent Dr. Hans-Dieter Orzechowski danke ich für die Überlassung des Themas, für die gewissenhafte Betreuung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die vielen informativen und hilfreichen Diskussionen von Versuchen und Ergebnissen.

Herrn Prof. Dr. Martin Paul als Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie möchte ich für die guten Forschungsbedingungen danken, die diese Arbeit ermöglichten.

Frau Birgitta Schwaneberg danke ich für ihre technische Hilfe, die wichtigen praktischen Tipps beim Anwenden der Methoden und für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und für die vielen anregenden Gespräche inner- und außerhalb des Labors möchte ich besonders Herrn Dr. Frank Zollmann, Ali Kassab-Bachi, Stefan Kliesch, Björn Bühring, Marwan Mannaa, Dr. Andreas Zimmermann, Dr. Maike Fahrenholz, Dr. Simone Geschwend, Uwe Sack, Nico Draheim und Frau Dr. Juliane Bolbrinker sowie allen anderen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung danken.

Außerdem gilt mein besonderer Dank meinen Eltern Margot und Karsten Bremer, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akt	synonym für Proteinkinase B (PKB), Serin/Threonin-Kinase
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammonium Persulfat
ATG	Basensequenz, die das Start-Codon für die Translation darstellt
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Mitglied der Bcl-2 Familie; wird durch p53 induziert und fördert die Apoptose
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , antiapoptotisches Mitglied der gleichnamigen Proteinfamilie
BigET	Big Endothelin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	<i>cyclic AMP</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CBF	<i>CCAAT binding factor</i> (CCAAT bindender Transkriptionsfaktor)
CCAAT Box	DNA-Sequenz CCAAT in Promotoren
cdk	<i>cyclin dependend kinase</i> (Cyclin abhängige Kinase)
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (Zellmedium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>dimerization protein</i>
DTT	Dithiothreitol
E2F	Transkriptionsfaktor, identifiziert durch die Bedeutung für den adenoviralen E2-Promotor
ECE	<i>Endothelin-Converting-Enzyme</i> (Endothelin-Konvertierungsenzym)
ECEL-1	ECE-like-1 = XCE
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	<i>EGF receptor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ET	Endothelin, Endothelin, Endothelin
ET _A	Endothelinrezeptor A
ET _B	Endothelinrezeptor B
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
G ₀ , G ₁ , G ₂	G = <i>gap</i> (Lücke), Bezeichnung von Zellzyklusphasen
GATA	Transkriptionsfaktor mit Affinität zur DNA-Sequenz GATA
GBM	Glioblastoma multiforme
HAT	Zusatz für Zellkulturmedien mit Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin
HEPES	Hydroxyethyl-piperazineethanesulfonic acid (Puffer)
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IP3	Inositoltriphosphat
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
LucF	<i>firefly</i> -Luciferaseaktivität
LucR	<i>renilla</i> -Luciferaseaktivität
M	Molar bzw. Mitosephase des Zellzyklusses
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Kinase), z.B. ERK1/ERK2 = <i>extracellular signal-regulated kinase</i> ; aktive ERK gelangt in den Zellkern und kann dort Transkriptionsfaktoren aktivieren
MCDB 131	Zellmedium
MEK	MEK phosphoryliert und aktiviert MAPK
MEM	<i>minimum essential medium</i> (Zellmedium)
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NEAA	<i>non-essential aminoacids</i> (nichtessentielle Aminosäuren)
NEP	Neutrale Endopeptidase
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i> = CBF
ODN	Oligodesoxynukleotid
OPTIMEM	Zellmedium
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Puffer)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	<i>platelet- derived growth factor</i>
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPET	Prepro-Endothelin
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i> , Kinase, die MEK phosphoryliert und aktiviert
Ras	<i>rat sarcoma</i> , Proto-Onkogen und kleines G-Protein, wird durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert; aktiviertes Ras erhöht die Aktivität der Raf Kinase
Rb	Retinoblastomprotein pRb
RLA	Relative Luciferaseaktivität
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>ribonuclease protection assay</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI 1640	Zellmedium, benannt nach Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	S (Synthese)-Phase des Zellzyklus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzel Nukleotid Polymorphismus)
SP1	Transkriptionsfaktor
SV40	Simianes Virus 40
TATA Box	DNA-Sequenz TATA in Promotoren
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris <i>buffered saline</i> (Puffer)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNED	Tris-NaCl-EDTA-DTT Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
uPA	<i>Urokinase type plasminogen activator</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
W/V	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

3 EINLEITUNG

3.1 Tumoren des Nervensystems

Zu den Tumoren des Nervensystems gehören primäre Hirntumoren, die aus Strukturen des Nervensystems hervorgehen sowie zerebrale Metastasen primär extrakranieller Tumoren (sekundäre Hirntumoren). Zu den primären Hirntumoren zählen die in dieser Arbeit untersuchten neuroepithelialen (glialen sowie neuroblastären) und die meningealen Tumoren. In Deutschland beträgt die jährliche Inzidenz der Gliome etwa 4 pro 100.000 Einwohner, wobei etwa 50% der primären Hirntumoren Gliome sind [1].

3.1.1 Gliale Tumoren des Nervensystems

3.1.1.1 Einteilung glialer Tumoren

Zu den glialen Tumoren zählen astrozytäre und oligodendrogliale Tumoren sowie gemischte Gliome. Nach der Einteilung der WHO werden die glialen Tumoren vier Malignitätsgraden I bis IV zugeordnet [2]. Einige Autoren teilen die glialen Tumoren nach ihrem Potential zur Invasion und Progression zu höhermalignen Formen in zwei Hauptklassen ein, wobei die eine Klasse durch geringe Invasion und geringe Tendenz zur malignen Transformation gekennzeichnet ist. Zu ihr zählt das pilozytische Astrozytom (WHO Grad I). Die andere Klasse beinhaltet die diffusen astrozytären Tumoren, die sich durch diffuse Infiltration des umgebenden Gewebes und hohes Potential zur Tumorprogression auszeichnen. Zu der letztgenannten Klasse zählen das Diffuse Astrozytom (WHO Grad II), das Anaplastische Astrozytom (WHO Grad III) und das Glioblastoma multiforme (GBM), auch Glioblastom genannt (WHO Grad IV) [3]. Die diffus infiltrierenden Astrozytome sind für über 60% der primären Hirntumoren verantwortlich. Glioblastome werden weiter eingeteilt in primäre und sekundäre Glioblastome. Während sich die sekundären Glioblastome aus einem zuvor diagnostizierten Diffusen oder Anaplastischen Astrozytom entwickeln und daher einen längeren klinischen Verlauf haben, entstehen die primären Glioblastome *de novo*. Sie machen mit 95% die Mehrheit der Glioblastome aus und sind durch eine kurze klinische Vorgeschichte gekennzeichnet [4]. Gliosarkome sind Varianten von Glioblastomen, die alternierend Areale glialer und mesenchymaler Differenzierungen aufweisen. Oligodendrogliome lassen sich weiter unterteilen in Oligodendrogliome (WHO Grad II) und Anaplastische Oligodendrogliome (WHO Grad III). Sie machen 4 bis 18% der

primären Hirntumoren aus. Gemischte Gliome bestehen aus mindestens zwei verschiedenen glialen Linien (astrozytär, oligodendroglial oder ependymal). Zu den gemischten Gliomen zählt das Oligoastrozytom (WHO Grad II), dessen Zellen morphologisch Oligodendroglion- und diffusen Astrozytomzellen entsprechen [2].

3.1.1.2 Lokalisation, Alters- und Geschlechtsverteilung glialer Tumoren

Die astrozytären Tumoren unterscheiden sich in ihrer intrakraniellen Lokalisation sowie in der Alters- und Geschlechtsverteilung. Pilozytische Astrozytome kommen vor allem bei Kindern und meist im Kleinhirn, im Nervus opticus und im Chiasma opticum, im Hypothalamus oder in der Medulla oblongata vor. Sie betreffen beide Geschlechter gleichermaßen und haben eine geringe Tendenz zu Progression. Eine Heilung durch Operation ist möglich. Diffus infiltrierende Astrozytome entwickeln sich vor allem in den Großhirnhemisphären. Männer erkranken häufiger als Frauen an einem diffus infiltrierenden Astrozytom, der Altersgipfel liegt zwischen 25 und 50 Jahren. Glioblastome betreffen vor allem Menschen im Alter zwischen 45 und 70 Jahren, wobei die primären Glioblastome etwas später auftreten und die sekundären sich früher entwickeln. Der Altersgipfel Anaplastischer Astrozytome liegt zwischen dem der Diffusen Astrozytome und dem der Glioblastome. Oligodendrogliome sind gut differenzierte, diffus infiltrierend wachsende Tumoren mit einem Altersgipfel in der 5. bis 6. Lebensdekade, wobei etwa doppelt so viele Männer wie Frauen betroffen sind. Sie sind typischerweise in den Großhirnhemisphären lokalisiert. Anaplastische Oligodendrogliome wachsen diffus infiltrierend und sind histomorphologisch variabel.

3.1.1.3 Histopathologie astrozytärer Tumoren

Die histopathologische Einteilung der Astrozytome richtet sich nach dem Tumoranteil mit dem höchsten Malignitätsgrad. Anaplastische Astrozytome unterscheiden sich von diffusen Astrozytomen durch ihr höheres Zellreichtum, die Zellen sind pleomorpher. Die Zellkerne sind atypisch und die mitotische Aktivität histologisch erkennbar. Glioblastome weisen anderes als Astrozytome des WHO Grads II und III Endothelproliferationen und Tumornekrosen auf. Die Zellularität ist weiter erhöht [3, 5].

3.1.1.4 Molekulare Pathologie astrozytärer Tumoren

Es konnten zahlreiche genetische Veränderungen in astrozytären Tumoren identifiziert werden. Die häufigste genetische Veränderung in Glioblastomen ist der vollständige

oder partielle Verlust der Heterozygotie von Chromosom 10, die in bis zu 80 % aller primären und sekundären Glioblastome gefunden wurde. Zahlreiche weitere chromosomale Veränderungen sind bekannt [5]. Obwohl in primären und sekundären Glioblastomen jeweils unterschiedliche genetische Veränderungen gefunden werden und auch unterschiedliche Genprodukte betroffen sind, sind die dadurch alterierten zellulären Signaltransduktionswege teilweise die gleichen. Häufig verändert sind der p53-, der Retinoblastom-Protein (Rb)- und der *epidermal growth factor receptor* (EGFR)- Signaltransduktionsweg. Während sowohl Astrozytome WHO Grad II und III als auch sekundäre Glioblastome häufig Mutationen von p53 zeigen, kommt es bei Glioblastomen zusätzlich oft zu einer Alteration in Signaltransduktionswegen von Rb oder Wachstumsfaktoren. Der Tumorsuppressor p53 ist in über 65% der sekundären Glioblastome, in über 50% der Astrozytome WHO Grad II und III, jedoch nur in ca. 28% der primären Glioblastome mutiert [4, 5]. Normalerweise führt der Transkriptionsfaktor p53 infolge eines Stress-Signals, z.B. einer DNA-Schädigung zum Zellzyklusarrest oder zu Apoptose [6]. Rb spielt eine zentrale Rolle in der Kontrolle von Zellzyklus und Aktivierung der DNA-Replikation, indem es im unphosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor E2F bindet und dadurch die Expression von E2F-Zielgenen hemmt [7]. Mutationen, die die physiologische Komplexierung zwischen E2F und Rb beeinträchtigen, können zur unphysiologischen Aktivierung von E2F-Zielgenen führen. Signaltransduktionswege der Wachstumsfaktoren sind ebenfalls häufig in glialen Tumoren alteriert. EGFR und *platelet-derived growth factor- α* (PDGF α) sind in den diffus infiltrierenden Astrozytomen häufig überexprimiert, EGFR in über 60% der primären Glioblastome und in fast 10% der sekundären Glioblastomen. Überexprimierte Rezeptoren können durch lokale Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Eine Mutation des Rezeptors kann dessen konstitutionelle Aktivierung bewirken, die unabhängig von der Anwesenheit des Liganden ist [8].

3.1.1.5 Prognose glialer Tumoren

Unter den astrozytären Tumoren ist das Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) am häufigsten und auch am aggressivsten. Die mediane Überlebenszeit beträgt alterabhängig 1,6 bis 8,8 Monate [9]. Unter optimaler Radio-Chemotherapie wurde in Studien eine Überlebenszeit von 14,6 Monate nach der initialen Diagnose erreicht [10]. Operation, Radio- und Chemotherapie bringen insgesamt eine Verbesserung der Lebensqualität sowie eine Verlängerung des Überlebens von 3 bis 9 Monaten [11].

Patienten mit Astrozytomen (WHO Grad II und III) haben bei einer medianen Überlebenszeit von 5,6 (Grad II) bzw. 1,6 Jahren (Grad III) ebenfalls eine schlechte Prognose. Bei einem Oligodendrogliom (WHO Grad II) liegt die mediane Überlebenszeit bei 11,6 Jahren [9].

3.1.2 Neuroblastäre Tumoren

Zu den neuroblastären Tumoren zählen die des sympathischen Nervensystems und der Nebenniere, die meist vor dem 10. Lebensjahr auftreten. Selten sind olfaktorische Neuroblastome in der Nasenhöhle [2].

3.1.3 Meningeale Tumoren

Meningeome gehören zu den meningealen Tumoren, sie leiten sich von arachnoidalen Zellen ab und sind daher Dura-assoziiert. Sie wachsen meist langsam und sind oft benigne (WHO Grad I), eine Heilung durch Operation ist möglich. Sie machen etwa ein Viertel der primären Hirntumoren aus. Anaplastische Meningeome (WHO Grad III) haben eine schlechte Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von unter 2 Jahren. Meningeome (WHO Grad I) treten v.a. in der 6. oder 7. Lebensdekade auf und betreffen etwas häufiger Frauen als Männer. Anaplastische Meningeome betreffen häufiger Männer [2].

Tab. 1 Übersicht über primäre Tumoren des Nervensystems (Auswahl) [2]

Neuroepitheliale Tumoren	▶ gliale	▶ astrozytäre	▶ Pilozytisches Astrozytom (WHO-Grad I) ▶ Diffuses Astrozytom (WHO-Grad II) ▶ Anaplastisches Astrozytom (WHO-Grad III) ▶ Glioblastoma multiforme (WHO-Grad IV) Unterform: Gliosarkom
		▶ oligodendrogliale	▶ Oligodendrogliom (WHO-Grad II) ▶ Anaplastisches Oligodendrogliom (WHO-Grad III)
		▶ gemischte	▶ Oligoastrozytom (WHO-Grad II)
		▶ neuroblastäre	▶ Olfaktorisches Neuroblastom ▶ Neuroblastische Tumoren des sympathischen Nervensystems und der Nebenniere
Meningeale Tumoren			▶ Meningeom (WHO-Grad I) ▶ Anaplastisches Meningeom (WHO-Grad III)

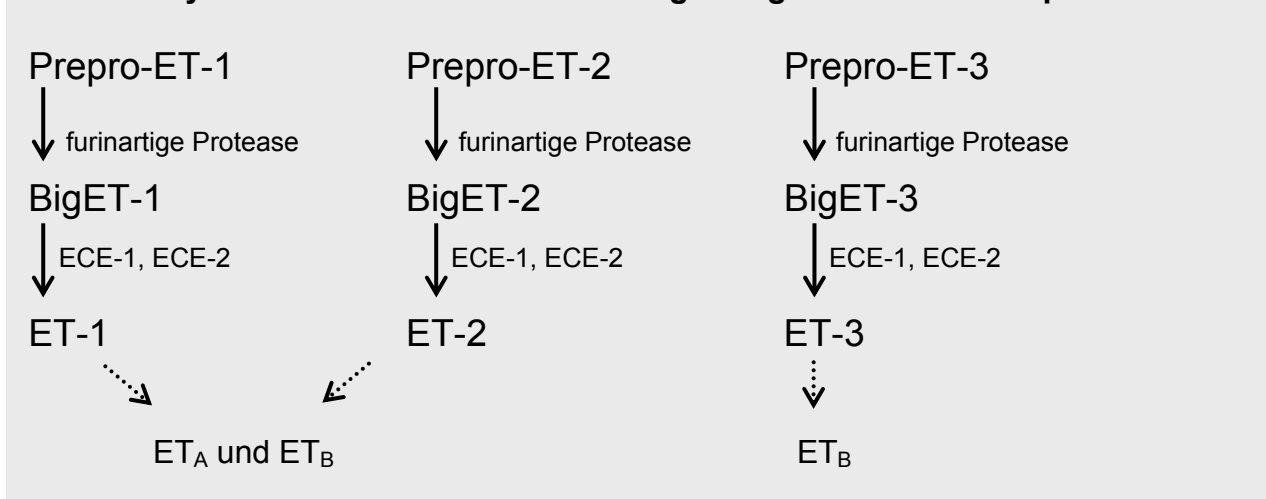
3.2 Das Endothelinsystem

Endothelin (ET) wurde isoliert und initial charakterisiert als ein vom Endothel gebildeter vasokonstriktorischer Faktor [12]. Zu der Familie der Endotheline gehören die drei durch separate Gene kodierten Peptide ET-1, ET-2 und ET-3. Die Effekte der Endotheline werden bei Vertebraten über die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ET_A und ET_B vermittelt. ET_A besitzt vor allem Affinität für ET-1 und ET-2, während alle drei Endotheline ungefähr gleich stark an ET_B binden [13, 14].

3.2.1 Biosynthese der Endotheline

Endothelin wird zunächst in Form seiner ~200 Aminosäuren großen Vorstufe Prepro-Endothelin (PPET) synthetisiert. Eine furinartige Endopeptidase spaltet PPET zum 38 (speziesabhängig 37-41) Aminosäuren großen Big-Endothelin (BigET). Für den letzten Prozessierungsschritt, die Spaltung zu den 21 Aminosäuren großen Endothelinen sind Zink-Metalloproteasen, die Endothelin-Konvertierungsenzyme-1 und -2 (ECE-1 und ECE-2) verantwortlich (Abb. 1). Die Halbwertszeit zirkulierenden Endothelins beträgt etwa sieben Minuten. Die Clearance des Endothelins erfolgt zum einen über die ET_B-vermittelte Aufnahme und den lysosomalen Abbau, zum anderen über die Spaltung durch extrazelluläre Neutrale Endopeptidase (NEP) [13, 14].

Abb. 1 Biosynthese der Endotheline und zugehörige Endothelinrezeptoren



3.2.2 Expression der Endotheline

Endotheline sind in diversen Zellen und Geweben nachweisbar. ET-1 wird v.a. in Endothelzellen, in vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen, aber auch in Neuronen, Astrozyten und vielen anderen Geweben exprimiert [15], ET-2 wird v.a. in Nieren und

Darm, ET-3 in hohen Konzentrationen im Gehirn, aber auch im Gastrointestinaltrakt, in Lungen und Nieren nachgewiesen [14]. ET-1 ist das dominierende Endothelin im Nervensystem, abgesehen von dem vorwiegenden Vorkommen von ET-3 in der Hypophyse [16, 17].

3.2.3 Funktionelle Bedeutung des Endothelinsystems

Das Endothelinsystem ist neben der Vasokonstriktion an physiologischen Prozessen der Gewebeentwicklung und -differenzierung, der Zellproliferation und der Hormonproduktion beteiligt. Außerdem spielt es eine Rolle bei einigen Erkrankungen, wie der pulmonalen und arteriellen Hypertonie, dem Asthma bronchiale sowie mehreren Tumorerkrankungen [18].

Die biologische Bedeutung des Endothelinsystems zeigt sich nicht zuletzt auch anhand des Phänotyps von *Knockout* Mäusen [13], der u.a. auf die Notwendigkeit von ET-3 und ET_B- Rezeptor für eine korrekte Entwicklung von aus der Neuralleiste abstammenden Melanozyten und enterischen Neuronen hinweist. So fehlen in ET-3 und ET_B-Rezeptor defizienten Mäusen Ganglienzellen des Plexus myentericus, wodurch die Tiere Veränderungen ähnlich denen des Morbus Hirschsprungs aufweisen. Weiterhin fehlen partiell epidermale Melanozyten, so dass es zu Depigmentierungen des Fells und der Haut kommt [19, 20]. ET-1 und ET_A- Rezeptor sind hingegen nötig für die Entwicklung kraniofazialer Strukturen und des kardialen Ausflusstrakts. Die jeweiligen *Knockout* Mäuse sterben kurz nach der Geburt. [21-24]. ECE-1 *Knockout* Mäuse zeigen einen kombinierten Phänotyp (ähnlich ET-1/ ET_A und ET-3/ ET_B), aus dem die Bedeutung von ECE-1 für die embryonale Prozessierung von BigET-1 und BigET-3 klar hervorgeht [25]. In transgenen Mäusen, denen ECE-1 und zusätzlich ECE-2 fehlen, ist der Phänotyp, vor allem hinsichtlich der Malformationen des kardialen Ausflusstrakts, verstärkt, wohingegen sich die reinen ECE-2 *Knockout* Mäuse normal entwickeln [26].

3.2.4 Die Rolle des Endothelinsystem bei Tumorerkrankungen

Einerseits wurde bei einigen Tumorerkrankungen eine gesteigerte Expression von Komponenten des Endothelinsystems gefunden, andererseits werden dem Endothelinsystem unterschiedliche Funktionen in verschiedenen humanen Tumoren zugeschrieben. So ist Endothelin an Zellwachstumsförderung, Angiogenese und Apoptosehemmung beteiligt [27]. Weiterhin beeinflusst das Endothelinsystem die Tumordinvasion und osteoblastische Knochenmetastasen [28, 29].

3.2.4.1 Expression des Endothelinsystems in extrakraniellen Tumoren

In vielen extrakraniellen Tumoren wurden Komponenten des Endothelinsystems nachgewiesen. So exprimieren viele humane Tumorzelllinien ET-1, darunter kolorektale, Brust-, Magen-, Prostata-, Ovarial- und Zervixkarzinom-Zelllinien [30-33]. Erhöhte Plasmaspiegel von ET-1 wurden bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom [34], metastasiertem Prostatakarzinom [35] und kolorektalen Karzinomen mit Lebermetastasen [36] gefunden. In Prostatakarzinomen ist die lokale ET-1 Konzentration im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht. Eine höhere ET_A-Dichte ist dabei mit fortgeschrittenem Tumorstadium und höherem Tumor-Grad assoziiert. ET_B, der die ET-1 Clearance fördert, wird hingegen vermindert exprimiert. ET-1 stimuliert die Proliferation von Osteoblasten und reduziert die Knochenresorption durch Osteoklasten sowie deren Motilität beim Prostatakarzinom mit osteoblastischen Knochenmetastasen [28, 37]. PPET-1 und ECE-1 mRNA werden in Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu normalen Kolonzellen überexprimiert [38]. Die Expression von ET_A ist in kolorektalem Tumorgewebe verglichen mit normalen Kolongewebe signifikant erhöht und die von ET_B vermindert [31]. Auch in Ovarial- [39] und Mammakarzinomen [40] wird ET-1 im Vergleich zu den normalen Geweben stärker exprimiert. Weiterhin korreliert die ET-1 sowie die ET-Rezeptor-Expression mit Parametern der Aggressivität von Mammakarzinomen, so wurde bei Patienten mit kürzerer erkrankungsfreier Überlebenszeit, eine höhere Expression von ET_A im Tumorgewebe nachgewiesen [41]. BigET-1, nicht aber ET-1 ist beim hepatozellulären Karzinom gegenüber normalem Lebergewebe immunhistochemisch vermehrt nachweisbar [42].

3.2.4.2 Expression des Endothelinsystems in Gehirn und intrakraniellen Tumoren

Im gesunden Gehirn wurde ET_A in Gefäßen und Meningen, ET_B in der grauen und weißen Substanz, auf Gliazellen und Neuronen detektiert [43, 44]. Eine weitere immunhistochemische Untersuchung des normalen humanen ZNS wies ET und ET_B in nahezu allen untersuchten Hirnregionen nach, wobei ET_B nicht auf normalen glialen Zellen detektiert wurde. ET_A war im Thalamus, Hypothalamus, im limbischen System, im Cerebellum sowie in der glatten Gefäßmuskulatur vorhanden [45].

Die Expression und Lokalisation von Komponenten des Endothelinsystems in intrakraniellen Tumoren wurde insbesondere in Glioblastomen und Meningeomen untersucht. Immunhistochemisch und autoradiographisch wurde in humanen Glioblastomen die Expression von PPET-1, ECE-1 und ET_A vor allem in vaskulären

Strukturen detektiert. ET_B und auch ECE-1 wurden in Tumorzellen nachgewiesen [46]. Die humane Glioblastom-Zelllinie T98G produziert und sezerniert ET-1 und exprimiert ET_A und ET_B [47]. ET_A wurde in Meningeomen nachgewiesen [43, 48, 49].

Bisher existieren nur wenige Studien, in denen das Expressionssniveau des Endothelinsystems in intrakraniellen Tumoren mit dem im gesunden Gewebe verglichen wird. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass die Expression von ET-1 mit dem Malignitätsgrad und der Vaskularisierung von humanen glialen Tumoren korreliert. Endothelzellen in allen Tumoren waren dabei positiv für ET-1 [50]. Unklar bleibt dabei, ob die höhere ET-1 Expression lediglich auf der stärkeren Vaskularisierung bei vaskulärer Expression von ET-1 in höhermalignen Tumoren beruht oder ob es sich tatsächlich um eine davon unabhängig stärkere ET-1 Expression handelt. Im Diffusen Astrozytom wurde immunhistochemisch die Expression von ET-1 und ECE-1 in 75% der Tumorzellen nachgewiesen. Auch die beiden ET-Rezeptoren waren auf vielen Astrozytomzellen nachweisbar [51]. Eine andere Studie zeigte, dass im humanen GBM die ET_A Dichte höher war als im gesunden Gehirn [43].

3.2.4.3 Endothelin als Mitogen

Endothelin wirkt auf verschiedene Zelltypen als Mitogen. ET bindet an den G-Protein gekoppelten ET_A und kann darüber sowohl Phospholipase C (PLC) als auch Tyrosinkinase aktivieren. Durch Aktivierung der PLC werden Diacylglycerin (DAG) sowie Inositoltriphosphat (IP₃) freigesetzt. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), IP₃ bewirkt die Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die Aktivierung von Tyrosinkinase induziert den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signaltransduktionsweg über Raf, MEK1/2 und ERK1/2. Die Mobilisation intrazellulären Calciums, die Aktivierung der PKC sowie des MAPK Signaltransduktionswegs induzieren die Transkription von die Zellproliferation fördernden Protooncogene c-fos, c-jun und c-myc [28]. ET_A-Aktivierung bewirkt außerdem die Transaktivierung des EGFR, die als zusätzlicher Weg der ET- vermittelten MAPK-Aktivierung und Wachstumsstimulation identifiziert werden konnte [52, 53]. Weiterhin sind synergistische Effekte des Endothelins mit zahlreichen Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), Insulin, *insulin-like growth factor* (IGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF) und Interleukin-6 (IL-6) beschrieben, wobei ET-1 die Rolle eines Ko-Mitogens einnimmt.

Einige Wachstumsfaktoren wiederum stimulieren die Expression von ET-1 Produktion [28, 54].

ET-1 steigert die Proliferation verschiedener Zelllinien, u.a. des Zervixkarzinoms und des Kaposi Sarkoms [32, 55]. In der Regel wird dieser wachstumsfördernde Effekt in epithelialen Zellen (primär kultivierte Ovariakarzinomzellen, humane Ovariakarzinomzelllinie, Prostatakarzinomzellen, humane kolorektale Zelllinien) über ET_A vermittelt [31, 33, 37, 39]. Auch in kultivierten humanen Meningeomzellen hemmte selektiver ET_A-Antagonismus den proliferationssteigernden Effekt des ET-1 [49, 56]. Die Proliferation von Melanomzellen wird jedoch über ET_B stimuliert und bei Kaposi Sarkom-Zellen sind beide Rezeptorsubtypen für die Stimulation der Proliferation verantwortlich [27]. In einer humanen glialen Tumorzelllinie [57], in Astrozyten-Primärkulturen der Ratte und einer glialen Rattenzelllinie wurde nach ET-1 Zugabe ebenfalls eine Proliferationssteigerung beobachtet [17, 58, 59]. In den Astrozyten-Primärkulturen war dieser Effekt durch ET_B-Antagonisten inhibierbar [60]. ET-1 Exposition einer anderen humanen glialen Zelllinie induzierte zwar transient eine ERK Phosphorylierung, eine Steigerung der Proliferationsrate, gemessen am ³H-Thymidineinbau war allerdings nicht nachweisbar [46].

3.2.4.4 Endothelin und Apoptose

In diversen Zellen konnte ein antiapoptotischer Effekt des Endothelins gezeigt werden, der je nach Zellart über ET_A oder ET_B vermittelt wird. Durch Aktivierung von ET_A kann ET-1 die Paclitaxel-induzierte Apoptose in Prostatakarzinomzellen und beim Ovariakarzinom hemmen, wobei die Reduktion pro-apoptotischer Proteine wie Bax, die Triggerung antiapoptotischer Signale wie Bcl-2 und die Phosphorylierung und damit Aktivierung der antiapoptotischen Kinase Akt beobachtet wurden [29, 61]. In glatten Gefäßmuskelzellen hemmt ET-1 ebenfalls die Paclitaxel-induzierte Apoptose [62]. Die in Endothelzellen beobachtete Apoptosehemmung durch ET-1 wird über ET_B vermittelt [63]. Bosentan, ein ET_A- und ET_B-Antagonist kann in Kolonkarzinomzellen der Ratte die FasL- induzierte Apoptose potenzieren, welche wiederum durch ET-1 Gabe gehemmt werden kann [64]. Bosentan in hohen Konzentrationen stimuliert die Apoptose auch in von Glioblastomen abgeleiteten glialen Zelllinien [46].

3.2.4.5 Endothelin und Angiogenese

Angiogenese ist ein wichtiger Faktor während der Tumorprogression. ET-1 steigert die Proliferation vaskulärer Zellen, dies erfolgt in Endothelzellen über ET_B und in glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten über ET_A. Beispielsweise stimuliert ET-1 die DNA Synthese in kapillären Endothelzellen aus dem Gehirn [65] sowie in vaskulären glatten Gefäßmuskeln der Ratte [66]. In der Rattencornea wirken ET-1 und -3 über ET_A stark angiogenetisch [67]. Weiterhin regt ET-1 endotheliale HUVEC Zellen auf Matrigel zur Bildung von tubulären Strukturen an, dies wird als in vitro Modell der Angiogenese angesehen [68]. Zum Teil wird der angiogenetische Effekt des Endothelins über den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) vermittelt, der eine wesentliche Rolle in der hypoxieinduzierten Neovaskularisation spielt. In Ovarialkarzinomzelllinien kann die Zugabe von ET-1 dosisabhängig über ET_A die VEGF-Expression erhöhen [69]. Die Expression von ET-1 korreliert mit der Gefäßdichte und VEGF-Expression im Ovarialkarzinom- und im Mammakarzinomgewebe [70].

3.2.4.6 Endothelin und Tumorinvasion

ET-1 kann über ET_A die Aktivität von Proteinasen induzieren, die die Tumorinvasion durch den Abbau der extrazellulären Matrix fördern. Dabei werden mRNA Expression, Zymogen-Sekretion sowie Proenzymaktivierung verschiedener Matrix Metalloproteinasen (MMP) und des *urokinase type plasminogen activator* (uPA) verstärkt. ET-1 reduziert ferner die Expression von Metalloprotease-Inhibitoren und induziert die Tumorinvasion von Ovarialkarzinomzellen im Matrigelmodell [29].

3.2.5 Endothelin-Konvertierungsenzym (ECE)

ECE ist für die Bildung der Endotheline aus BigET essentiell. ECE-1 wurde zunächst aus vaskulären Endothelzellen sowie aus der Lunge der Ratte isoliert und charakterisiert [71-73]. ECE-1 ist eine membrangebundene Metalloprotease mit Aktivitätsmaximum bei neutralem pH. Sie spaltet BigET intrazellulär oder an der Zelloberfläche zum biologisch aktiven Endothelin. Vier verschiedene ECE-1 Isoformen sind bekannt (siehe 3.2.5.2). Später konnte die Expression von ECE-1 auch in einer humanen neuroblastären, einer humanen glialen Zelllinie sowie einer glialen Zelllinie der Ratte nachgewiesen werden [74]. Das später entdeckte ECE-2 wird von einem anderen Gen kodiert. Bovines ECE-2 ist zu 59% identisch mit ECE-1, das Aktivitätsmaximum von ECE-2 liegt bei einem sauren pH und es wird eine strikt

intrazelluläre Lokalisation vermutet. Bei Rind und Maus wird ECE-2 vorwiegend in neuronalen Geweben exprimiert. [26, 75]. Durch kovalente Disulfidbindung liegen ECE-1 und -2 jeweils als Homodimer vor [76]. Beide gehören zur Familie der Neutralen Endopeptidasen (NEP-Familie), einer Gruppe von Zink-Metallopeptidasen, der außerdem das Blutgruppenantigen Kell, die Neutrale Endopeptidase (NEP oder Neprilysin) und das X converting enzyme (XCE, auch ECE-like 1 [ECEL-1] genannt) angehören. Kell kann BigET-3 ebenfalls in ET-3 spalten, dies allerdings mit niedriger Effizienz als ECE, so dass die physiologische Bedeutung unklar bleibt [76].

3.2.5.1 Funktionelle Bedeutung von ECE-1 als therapeutische Zielstruktur

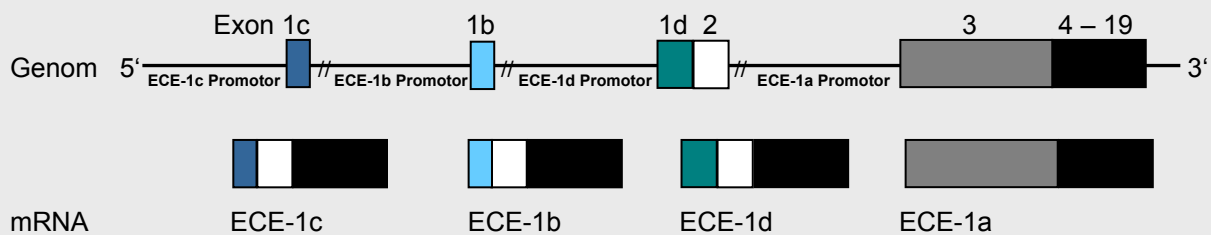
Die Bedeutung von ECE für die Aktivität des Endothelinsystems zeigt sich in der geringen biologischen Aktivität von BigET-1 im Vergleich zum ET-1, die für den vasokonstriktorischen Effekt bereits früh gezeigt wurde [77, 78]. Die Tatsache, dass ECE-1 *Knockout* Mäuse, phänotypisch die Merkmale von ET-1 und ET-3 bzw. ET-Rezeptor *Knockout* Mäusen kombiniert aufweisen, deutet ebenfalls auf die spezifische biologische Bedeutung von ECE-1 für die Endothelin-Synthese hin [25]. Neben BigET ist β -Amyloid ein weiteres Substrat für ECE in vivo, was im Zusammenhang mit Demenz vom Alzheimer-Typ bedeutsam sein könnte [79]. In vitro wurden neben BigET weitere Substrate von ECE-1 nachgewiesen: Bradykinin, Angiotensin I, Neurotensin, Substanz P, oxidierte Insulin- β -Kette und teilweise auch Calcitonin und ANP können hydrolytisch gespalten werden. Die Bedeutung dieser Substrate in vivo ist jedoch noch unklar [80].

3.2.5.2 Isoformen von ECE-1

Vier verschiedene Isoformen von ECE-1 sind bekannt, die als ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d bezeichnet werden und für deren Transkription alternative Promotoren verantwortlich sind [81-85]. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich lediglich in ihrem amino-terminalen, extrazytoplasmatischen Anteil. Die Exone 4-19 sind allen gemeinsam, so dass die katalytische Domäne gleich ist. ECE-1a hat zusätzlich das Exon 3, während bei ECE-1b die Exone 1b und 2 hinzukommen und Exon 3 bis auf die letzten 142 Basen durch intraexonisches Spleißen entfernt wird. ECE-1c mRNA setzt sich aus den Exonen 1c, 2 sowie 4-19 zusammen. Das d-spezifische Exon liegt zwischen Exon 1b und Exon 2 [82, 86-90]. Abb. 2 zeigt die Struktur des humanen ECE-1 Genlokus sowie die isoformspezifische Zusammensetzung der mRNA aus den

jeweiligen Exonen. Bei ähnlicher Enzymaktivität unterscheiden sich die Isoformen in ihrer Gewebeverteilung [81, 89] und subzellulären Lokalisation. Während ECE-1a und ECE-1d überwiegend Plasmamembran-assoziiert sind und Ektoenzyme darstellen, kommt ECE-1b offenbar nur intrazellulär vor. ECE-1c wird in beiden Lokalisationen detektiert [82, 90, 91]. ECE-1c scheint beim Menschen in den meisten Geweben exprimiert zu sein. In vielen Geweben wird es zumindest auf mRNA-Ebene deutlich stärker exprimiert als die anderen Isoformen [82, 83, 90].

Abb. 2 Struktur des humanen *ECE-1* Genlokus



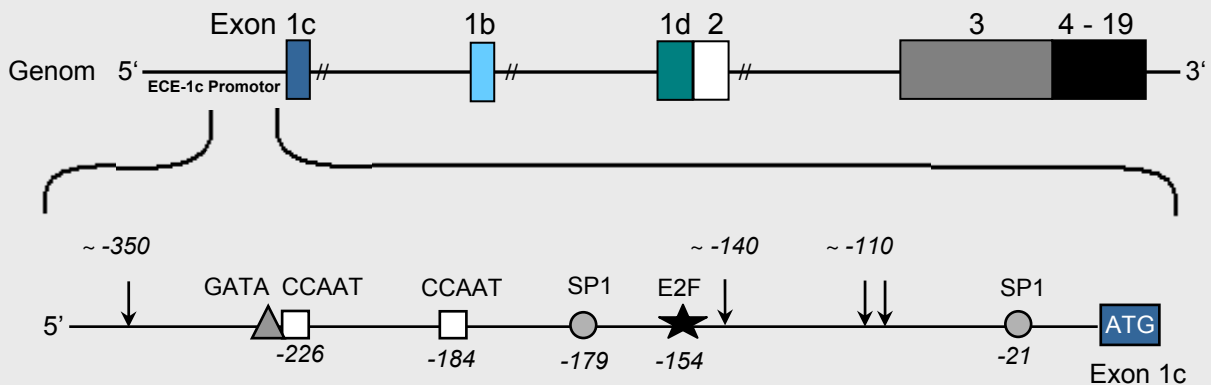
Die Abbildung zeigt nicht maßstabsgetreu die Struktur des *ECE-1* Genlokus sowie die aus den dargestellten Exonen zusammengesetzte isoformspezifische mRNA. Die isoformspezifischen Promotoren befinden sich genomisch jeweils unmittelbar 5' der Exone 1c (ECE-1c), 1b (ECE-1b), 1d (ECE-1d) bzw. 3 (ECE-1a).

3.2.5.3 Der ECE-1c Promotor

Der ECE-1c Promotor enthält, wie auch die Promotoren der anderen Isoformen, keine TATA-Box zur Initiation der Transkription. Abb. 3 zeigt seine Struktur mit den in unserer Arbeitsgruppe identifizierten funktionell wichtigen Elementen. Mit Hilfe von seriellen Deletionsmutanten des Promotors konnten in humanen Zelllinien positiv regulierende Elemente zwischen -142 und -240 bp sowie zwischen -290 und -490 bp identifiziert werden. Die Zahlen beziehen sich jeweils auf das putative Translationsstart-Codon in Exon 1c. Transkriptionelle Startpunkte waren mittels *ribonuclease protection assay* (RPA) bei etwa -110 bp, -140 bp sowie -350 bp nachweisbar (Abb. 3). Im Reporteragen Assay konnte die funktionelle Bedeutung des E2F Bindungsmotivs bei -154 bp in einer endothelialen sowie einer epithelialen Zelllinie gezeigt werden. Durch isolierte Mutagenese des Motivs wurde die Aktivität des Promotors auf 21% der Wildtyp-Aktivität reduziert, was auf dessen entscheidende Rolle für die basale Promotoraktivität hinweist. Im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) ließ sich die Bindung von E2F-2 aus endothelialen Kernextrakten an diesen Promotorabschnitt zeigen. Des Weiteren befinden sich im proximalen Promotor zwei Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor SP1, von denen nur das Element bei -179 bp einen positiven Effekt auf die

Promotoraktivität hat, sowie zwei CCAAT-Boxen. Die Bindung von CCAAT *binding factor* (CBF) aus endothelialen Kernextrakten konnte für die CCAAT-Box um -226 bp im EMSA gezeigt werden. GATA-2 besitzt ebenfalls ein Bindungsmotiv in diesem Bereich. Expression von GATA-2 führte in endothelialen Zellen zwar zur signifikanten Erhöhung der Promotoraktivität, konnte aber in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden [83, 92].

Abb. 3 Struktur des ECE-1c-Promotors



Abgebildet sind oben der *ECE-1* Genlokus und darunter vergrößert schematisch die Struktur des proximalen ECE-1c Promotors mit Lokalisation von Transkriptionsfaktor-Bindungsmotiven (Symbole) und transkriptionellen Startpunkten (Pfeile). Die kursiv angegebenen Zahlenwerte im ECE-1c Promotor beschreiben den Abstand zum Translationsstart-Codon ATG in Exon 1c in Basenpaaren.

3.2.5.4 Der ECE-1b Promotor

Durch Transfektion serieller Deletionsmutanten wurden im ECE-1b Promotor verschiedene positiv regulierende Promotorabschnitte, u.a. zwischen -273 bp und -478 bp, identifiziert. In diesem Bereich befindet sich eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor GATA [81]. Außerdem wurde in diesem Bereich bei -338 bp ein natürlicher Polymorphismus in Form eines *single nucleotide polymorphism* (SNP) gefunden, der ein E2F-Bindungsmotiv verändert: Adenin (-338A) bzw. Cytosin (-338C). -338A ist mit erhöhten Blutdruckwerten bei Frauen assoziiert [93]. Im Reportergen Assay ließ sich nachweisen, dass der Promotor mit -338A eine erhöhte Aktivität in einer endothelialen Zelllinie aufwies, dies war mit einer erhöhten Bindungsaffinität zu E2F-2 im EMSA assoziiert [94].

3.3 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression. Sie ermöglichen, dass Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung, in definierten Phasen des Zellzyklus, gewebespezifisch oder durch einen Stimulus induziert exprimiert werden.

Da in den ECE-1c und ECE-1b Promotoren Bindungsmotive für die Transkriptionsfaktoren E2F, GATA und CBF vorhanden sind, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden, werden diese Faktoren im Folgenden kurz charakterisiert.

3.3.1 E2F-Familie

Die E2F-Familienmitglieder regulieren die Genexpression in erster Linie abhängig von der Zellzyklusphase, wobei es teilweise gewebespezifische Unterschiede gibt. Es sind bis heute neun Mitglieder der E2F-Familie identifiziert worden. Für die transkriptionelle Aktivität ist die Bildung von Heterodimeren aus E2F und einem sog. *dimerization protein* (DP), DP1 oder DP2, wichtig. Die Aktivität von E2F-1 bis E2F-5 wird durch die sog. *pocket* Proteine, Rb, p130 oder p107 reguliert.

3.3.1.1 Funktion der E2F-Familienmitglieder

Die E2F Familie der Transkriptionsfaktoren ist entscheidend an der Zellzyklus-Kontrolle beteiligt. Zu den durch E2F regulierten Zielgenen zählen:

- **Zellzyklusregulatoren**, die u.a. für die G₁/S-Transition und damit für den Eintritt der Zelle in die S-Phase wichtig sind, z.B. Cycline, Cyclinabhängige Kinasen (Cdk), E2F selbst, der Tumorsuppressor Rb und das Protooncogen c-myc
- **Faktoren der DNA-Replikation**: Enzyme der Nukleotidsynthese wie Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, Thymidylatsynthase, DNA-Polymerase α und andere Komponenten der DNA-Replikationsmaschinerie [95-98]

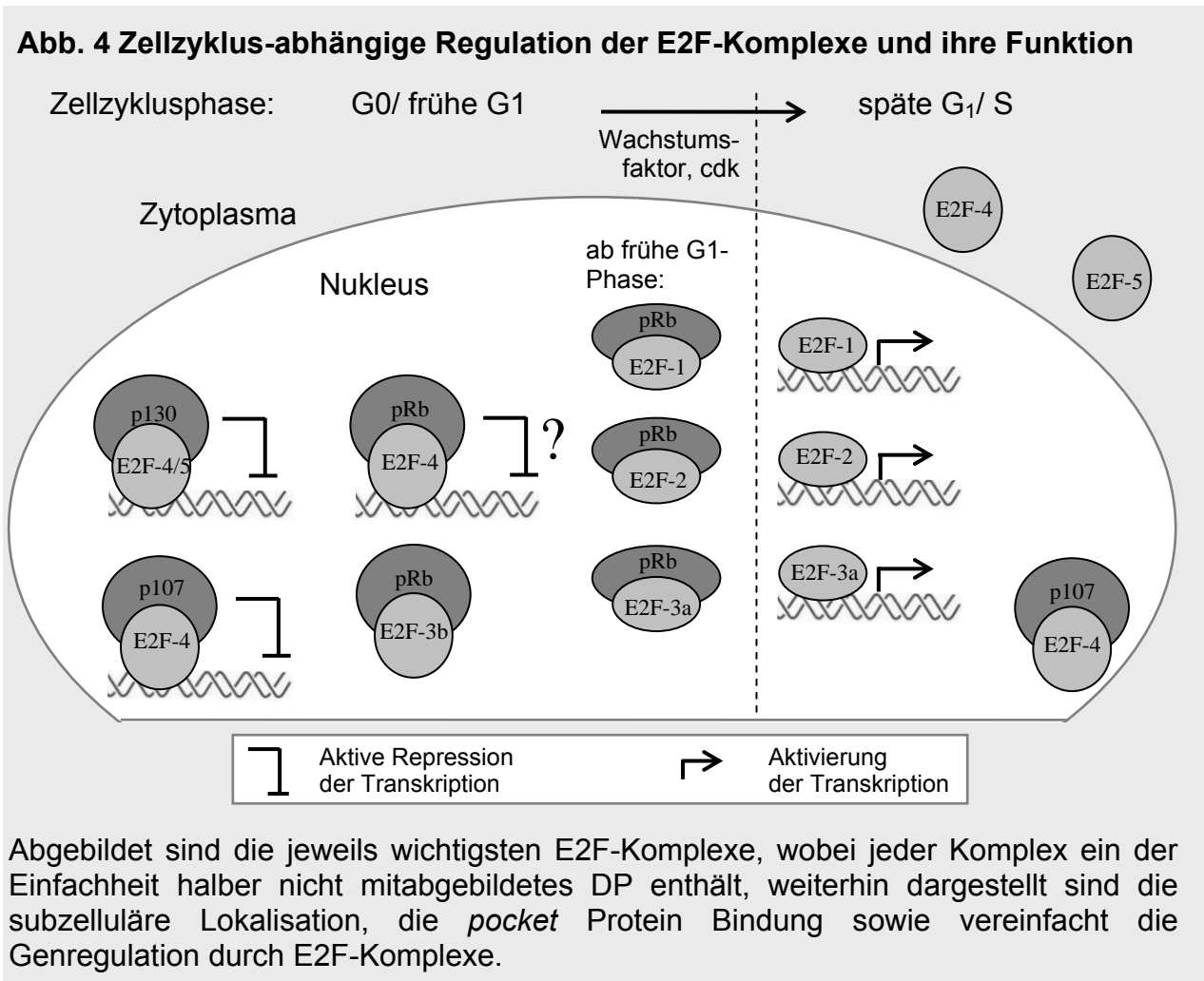
Überexpression von E2F kann in ruhenden G₀ Zellen [99] bzw. in Zellzyklus-arretierten Zellen [100] die Induktion der S-Phase und damit den Wiedereintritt in den Zellzyklus bewirken. Die Überexpression von E2F-1 führt z.B. in primären murinen Astrozyten zu einer neoplastischen Transformation [101]. Neben dieser „traditionellen“ Funktion der E2F-Transkriptionsfaktoren, der Kontrolle der Zellproliferation durch Regulation der G₁/S Transition, sind im Laufe der Jahre diverse andere, z.T. individuelle Funktionen bestimmter E2Fs, wie Beteiligung von E2F-1 an der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung (Apoptoseinduktion, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur), Regulation der Apoptose und Tumorsuppressorfunktion sowie wichtige Funktionen in Entwicklung und

Differenzierung, beobachtet worden [102]. Außerdem wird vermutet, dass E2F neben der G₁/S-Transition die generelle Zellzyklusprogression in mehreren Phasen, so auch die G₂/M-Transition reguliert. Einige durch E2F regulierte Gene sind auch für den regelrechten Ablauf der Mitose wichtig. Ferner gibt es Hinweise auf eine transkriptionsunabhängige Funktion von Rb und E2F im Rahmen der Regulation der DNA-Synthese durch Bindung an Komponenten der Replikationsmaschinerie [103].

3.3.1.2 Einteilung und Regulation der E2F-Familienmitglieder

Man kann die E2F-Familie nach Struktur und transkriptioneller Aktivität in Subgruppen einteilen. Alle E2F-Familienmitglieder haben mindestens eine Domäne für die DNA-Bindung. E2F-1 bis E2F-6 haben eine Domäne für die Dimerisierung mit DP. Nur E2F-1 bis E2F-5 haben Domänen für die Bindung an *pocket* Proteine sowie zur Transaktivierung, d.h. Domänen zur Aktivierung der Transkription durch Interaktion mit einem anderen Protein. E2F-1, -2 und -3a zählen zu den „aktivierenden“ E2Fs. Sie erhöhen die Transkription ihrer Zielgene und werden in sich teilenden Zellen nachgewiesen. Bestimmte Aminosäure-Sequenzen sind für ihre nukleäre Lokalisation verantwortlich. Diese aktivierenden E2Fs können den Übergang von der G₁- in die S-Phase induzieren und dadurch die Zellproliferation steigern. Sie ähneln sich besonders in den Domänen für die Bindung an die DNA bzw. an Rb sowie für die Dimerisierung mit DP [95, 97]. Neben dem ursprünglich identifizierten E2F-3, das jetzt als E2F-3a bezeichnet wird, konnte E2F-3b als ein durch einen alternativen Promotor im ersten Intron von E2F-3 reguliertes, amino-terminal verkürztes Genprodukt nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu E2F-3a wirkt E2F-3b hemmend auf die Transkription [104, 105]. Die Aktivität der aktivierenden E2Fs wird durch Rb reguliert, nicht aber durch die anderen *pocket* Proteine p107 und p130. Bindung an Rb reduziert den Anteil des freien E2Fs. *Pocket* Proteine hemmen die Transkription zum einen durch Bindung an die E2F-Transaktivierungsdomäne und dadurch verhinderte Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat, zum anderen kann der Komplex aus E2F, DP und *pocket* Protein an die entsprechenden Promotoren zu einer Rekrutierung histonmodifizierender Enzyme führen und durch Histon-Deacetylierung und -Methylierung die Transkription aktiv reprimieren [106, 107]. In der späten G₁-Phase wird Rb durch Cdk phosphoryliert, wodurch das Heterodimer aus aktivierendem E2F und DP frei wird und die Transkription der Zielgene induziert [95, 96, 105]. E2F-3b, -4 und -5 sind vor allem an der aktiven Repression ihrer Zielgene beteiligt. E2F-4 und -5

können dabei *pocket* Proteine (p107, p130 und Rb) zu den Promotoren rekrutieren und dadurch Histonmodifikationen induzieren, die wiederum eine aktive Repression der Genexpression bewirken. Sie sind auch in ruhenden Zellen (G_0) nachweisbar. E2F-4 und -5 besitzen Sequenzen, die als nukleäres Exportsignal dienen, so dass sie als Heterodimer mit DP hauptsächlich im Zytoplasma vorliegen. Durch Bindung an *pocket* Proteine können sie in den Kern transloziert werden. Dort hemmen sie in der G_0 - und frühen G_1 -Phase die Transkription der durch E2F regulierten Gene. Sie sind wichtig für das Verlassen des Zellzyklus und die terminale Differenzierung. Die Zellzyklus-abhängige Regulation der E2F-Komplexe und ihre Funktion ist in Abb. 4 dargestellt [95, 96, 105]. Bei E2F-6 fehlt die carboxy-terminale Sequenz für die Transaktivierung und *pocket* Protein Bindung. Es hemmt die Transkription unabhängig von *pocket* Proteinen durch Rekrutierung sog. *Polycomb*-Proteine [95-97].



Die kürzlich entdeckten Familienmitglieder E2F-7 und E2F-8 besitzen jeweils zwei DNA-Bindungsdomänen, ihnen fehlt eine Domäne für die Dimerisierung mit DP. Beide reprimieren die Transkription und hemmen die Zellzyklusprogression [108-110].

3.3.2 GATA-Familie

Die Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie haben eine wichtige Funktion in der Reifung und Differenzierung verschiedener Zellen, insbesondere während der Entwicklung. Der genaue Zeitpunkt und Ort der Expression einzelner GATA-Familienmitgliedern unterliegt einer komplexen transkriptionellen Regulation, z.T. durch verschiedene, oftmals weit entfernt liegende Enhancer und durch viele teilweise autoregulatorische GATA-Bindungsmotive. Bei Wirbeltieren wurden sechs GATA-Faktoren identifiziert, die wiederum mit verschiedenen Kofaktoren interagieren und in einem Multiproteinkomplex die Transkription ihrer Zielgene regulieren. Fünf der sechs GATA-Proteine werden jeweils durch zwei alternative Promotoren reguliert. Die GATA-Proteine lassen sich in zwei Subgruppen einteilen, deren Funktionen in erster Linie aus den Phänotypen von GATA-defizienten Mäusen abgeleitet wurden.

Die eine Subgruppe, bestehend aus GATA-1, -2 und -3, ist für die Hämatopoese wichtig. GATA-1 ist essentiell für die Differenzierung in der primitiven und definitiven Erythropoese und wird in erythrozytären Zellen, in Megakaryozyten, Mastzellen und Eosinophilen sowie in Sertoli-Zellen des Hodens exprimiert. Unter den GATA-Familienmitgliedern wurden GATA-2 und -3 im zentralen Nervensystem verschiedener Wirbeltiere während der Embryogenese nachgewiesen. GATA-2 ist ebenfalls an der Hämatopoese, insbesondere an der Entwicklung hämatopoetischer Vorläuferzellen beteiligt [111-113]. GATA-2 *Knockout* Mäuse sterben in der frühen Embryogenese mit einer Anämie [114]. Weiterhin ist GATA-2 wichtig für die Entwicklung des murinen Urogenitaltrakts, der ventralen Hypophyse sowie bestimmter spinaler Interneuronen [115] und wurde während der Embryogenese in diversen zerebralen Neuronen der Maus [116] und bestimmten zerebralen Strukturen des Huhns [117, 118] nachgewiesen. Die Expression von GATA-2 und -3 im ZNS der Maus ist größtenteils überlappend, wobei die Expression von GATA-3 abhängig ist vom Vorhandensein von GATA-2. GATA-2 *Knockout* Mäuse weisen Störungen in der Neurogenese auf [116]. GATA-3 wird in diversen murinen embryonalen Geweben exprimiert, im zentralen Nervensystem konnte eine vorübergehende Expression in verschiedenen Strukturen nachgewiesen werden. Weiterhin lässt sich GATA-3 im peripheren Nervensystem, in der Plazenta, den

Nieren und Nebennieren, der embryonalen Leber sowie im Thymus und in T-Lymphozyten detektieren. *GATA-3 Knockout* Mäuse zeigen nicht nur Störungen der Hämatopoese und innere Blutungen, sondern auch Entwicklungsstörungen des Neuralrohrs, des Neuroepithels und des ersten Kiemenbogens sowie kollabierte Hirnventrikel. Die Mäuse sterben ebenfalls in der frühen Embryogenese [119].

Die zweite Subgruppe aus *GATA-4*, *-5* und *-6* ist an der Entwicklung von Organen meso- oder entodermalen Ursprungs (Herz, Gonaden und Darm) beteiligt. *GATA-4* spielt außerdem eine Rolle bei der Herzmuskelhypertrophie und in der leberspezifischen Genexpression. *GATA-6* wird außerdem in glatten Gefäßmuskelzellen, in Nieren und Blase nachgewiesen und ist essentiell für die Lungenentwicklung. Ein im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtiges Zielgen von *GATA* ist *PPET-1*-Gen, an dessen Regulation *GATA-2* und *-4* beteiligt sind [120, 121].

3.3.3 CCAAT binding factor (CBF)

Die DNA-Sequenz CCAAT wird im Zusammenhang mit Promotoren als CCAAT-Box bezeichnet. Diese stellt ein häufiges und funktionell wichtiges Element in eukaryontischen Promotoren dar. 25-30% aller Promotoren weisen CCAAT-Boxen auf, wobei sie v.a. in zellzyklusabhängig regulierten Promotoren ohne TATA-Box vorhanden sind. Der Transkriptionsfaktor CBF [CCAAT binding factor, synonym mit NF-Y (*nuclear factor Y*)] ist ein wichtiger CCAAT-Box bindender Proteinkomplex, seine Konsensussequenz geht über das zentrale Pentanukleotid hinaus [122-125]. CBF ist ein Komplex aus den drei Untereinheiten CBF-B (NF-YA), CBF-A (NF-YB) und CBF-C (NF-YC). Es handelt sich um evolutionär hoch konservierte Proteine. CBF-A und CBF-C bilden zunächst ein Dimer. Die anschließende Bindung von CBF-B an das präformierte Dimer ist für die spezifische Bindung an die CCAAT-Box erforderlich [126, 127]. CBF-B und CBF-C besitzen hydrophobe, glutaminreiche Domänen für die Transaktivierung. CBF-A und CBF-C weisen Strukturen auf, die denen von Histonproteinen ähneln und funktionell wichtig sind, sog. *histone-folding motifs*. Diese können eine Verbiegung der DNA, das sog. *DNA-bending*, vermitteln, welches vermutlich einen wichtigen Mechanismus im Rahmen der Transkriptionsaktivierung durch CBF darstellt.

Anfangs wurde durch Untersuchung transformierter Zelllinien die konstitutive Expression von CBF postuliert. Später zeigte sich jedoch abhängig vom untersuchten Zellsystem eine zell-, zellzyklus- bzw. stimulusspezifische DNA-Bindungsaffinität von CBF. Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese v.a. durch Regulation der

Translation und Proteindegradierung von CBF-B zustande kommt. CBF kann mit verschiedenen Bestandteilen des basalen Transkriptionsapparates, mit generellen Transkriptionsfaktoren und mit weiteren Transkriptionsfaktoren, z.B. c-myc und p53 interagieren. Ferner ist die Assoziation zwischen CBF und Koaktivatoren der Transkription wie Histon-Acetyltransferasen beschrieben. Als weiterer Regulationsmechanismus wird die Acetylierung von CBF-A diskutiert [122-125].

4 FRAGESTELLUNG

Tumoren des Nervensystems, insbesondere höhergradige Astrozytome, weisen trotz wachsender Kenntnis über molekulare Pathomechanismen eine nahezu unverändert schlechte Prognose auf, die durch Ausschöpfung aller aktuell angewandten operativen, radio- und chemotherapeutischen Therapieoptionen nur gering verbessert werden kann. Es besteht daher ein großer Bedarf, die molekulare Pathogenese besser zu verstehen. Dies könnte zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen.

Komponenten des Endothelinsystems werden in humanen Tumoren des Nervensystems exprimiert. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen des Menschen konnte die funktionelle Bedeutung des Endothelinsystems gezeigt werden. Endothelin kann dabei an der Proliferation, der Angiogenese oder der Apoptosehemmung beteiligt sein. Das Endothelin-Konvertierungsenzym ECE-1 spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese der Endotheline.

Die Expression der verschiedenen ECE-1 Isoformen wird über alternative Promotoren reguliert. Durch die Charakterisierung in vitro konnten bereits zuvor funktionell relevante Promotorbereiche im ECE-1b und ECE-1c Gen identifiziert werden. In diesen Bereichen befinden sich Sequenzmotive für die Bindung von Transkriptionsfaktoren der Familien E2F, GATA und CBF.

Hauptziel dieser Arbeit war es, in humanen glialen und meningealen Tumoren sowie in Zelllinien glialen, endothelialen und neuroblastären Ursprungs die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die mit den isoformspezifischen Promotoren von ECE-1c und ECE-1b interagieren können. Dabei wurde auch die Proteinexpression der möglicherweise mit den genannten Promotoren interagierenden Transkriptionsfaktoren E2F-1, E2F-2, E2F-3, GATA-2, GATA-3 und CBF-A untersucht.

Weiterhin sollte analysiert werden, ob der natürliche Polymorphismus im E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor einen Einfluß auf die mögliche Bindung von E2F-Familienmitgliedern hat.

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in unten genannten Nährmedien im Zellinkubator bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 95% Sauerstoff und 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Passagiert wurden die Zellen alle sieben bzw. 14 Tage (U373 MG), wobei adhärent wachsende Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und nach Bedarf verdünnt wieder ausgesät wurden. Der Medienwechsel erfolgte zweimal wöchentlich.

5.1.1 Verwendete Zelllinien und Medien

Alle Medien enthielten zusätzlich 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

Zelllinie	Ursprung der Zelllinie	Medium und Zusätze
EA.hy926	Fusion von HUVEC (umbilikale Endothelzellen) mit humanem pulmonalen Adenokarzinom A549	DMEM (4,5 g/l Glucose) mit: 10% FCS HAT 1 x NEAA 1 mM Natrium-Pyruvat
HMEC-1	HDMEC (kutane Endothelzellen) transfiziert mit SV40-T	MCDB 131 mit: 5% FCS 10 ng/ml EGF 1 µg/ml Hydrocortison
Kelly	Humanes Neuroblastom	RPMI 1640 mit: 10% FCS 1 x NEAA 1 mM Natrium-Pyruvat
SK-N-MC	Metastase eines humanen Neuroblastoms	MEM mit: 10% FCS 1 x NEAA 1 mM Natrium-Pyruvat 1,5 g/l Natriumbicarbonat
U373 MG	Humanes Astrozytom Grad III	wie bei SK-N-MC

5.2 Gewebe

Die hier untersuchten Tumorgewebe sowie im Rahmen einer Hirnblutung entnommene, nicht neoplastisch veränderte Großhirnrinde wurden von der Abteilung für Neurochirurgie der Helios-Klinik in Berlin-Buch im Rahmen der Kooperation mit Dr. M. Synowitz zur Verfügung gestellt. Die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission zur

Durchführung der Untersuchungen lag vor. Das Gewebe wurde nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.3 Extraktion und Konzentrierung von Gesamtprotein

Je nach Verfügbarkeit wurden 30 bis 460 mg Gewebe in ein auf Eis gelagertes Polypropylen-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1ml Trizol Reagenz pro 50 mg Gewebe erfolgte die Homogenisierung mit Hilfe eines Ultra-Turrax T25 bei maximaler Umdrehung und schließlich die Extraktion der RNA. Aus dem verbliebenen Material wurden nun DNA und Proteine isoliert; wie im Protokoll des Herstellers von Trizol beschrieben. Die Proteine wurden schließlich in 1% wässriger SDS-Lösung gelöst. Um ECE-1 in den Proteinextrakten zu identifizieren, wurde die Konzentration mit Hilfe von Microcon Microconcentrators-100, wie vom Hersteller beschrieben, erhöht.

5.4 Extraktion zytosolischer und nukleärer Proteine

5.4.1 Prinzip

Nach dem Aufbrechen der Zellmembran in hypotonischer Lösung mit mechanischer Unterstützung erhält man zytosolisches Protein. Aus intakt gebliebenen Kernen werden anschließend durch Zugabe eines hypertonen Puffers die Proteine extrahiert.

5.4.2 Lösungen für die Extraktion zytosolischer und nukleärer Proteine

Puffer P1 pH 7,9		Puffer P2 pH 7,9	
HEPES-KOH	10 mM	HEPES-KOH	20mM
KCl	10 mM	Glycerin	20%
EGTA	0,1 mM	NaCl	300mM
DTT	1 mM	EGTA	1mM
Complete mit EDTA	1x	DTT	1mM
		Complete mit EDTA	1x

5.4.3 Durchführung

Die Proteinextraktion aus Geweben begann mit der Homogenisierung. Etwa 200 mg Gewebe wurden in ein Polypropylen-Röhrchen überführt, mit 2 ml PBS (incl. 1x Complete mit EDTA) versetzt und mittels Ultra-Turrax T25 auf minimaler Stufe homogenisiert, bis keine größeren Stücke mehr erkennbar waren. Aus adhären wachsenden kultivierten Zellen erfolgte die Proteinextraktion nachdem die Zellen einmal mit PBS gespült und dann in PBS mittels Zellschaber (*Cell Scraper*) abgeschabt wurden. Pro konfluente 150 cm^2 große Zellkulturflaschen wurden 15 ml 4°C kaltes PBS

(incl. 1 x Complete mit EDTA) verwendet. Separierte Zellen aus Geweben bzw. kultivierte Zellen wurden jeweils durch Zentrifugation (850 g, 10 min, 4°C) am Boden des Röhrchens gesammelt. Das Zellpellet wurde nach Zugabe von 1 ml hypotonischem Puffer P1 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellyse wurde mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (10 Hübe auf Eis) unterstützt. Um Effizienz der Zellyse und Intaktheit der Kerne zu überprüfen, erfolgte der Nachweis nukleärer Proteine im Western Blot und die Färbung der Kernsuspension mit Propidiumjodid, das bei zerstörter Zellmembran mit der DNA interkaliert, so dass die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop (Rhodaminfilter) sichtbar gemacht werden können. Kerne wurden durch Zentrifugation (2.000 g, 5 min, 4°C) gesammelt. Der Überstand, der die zytosolische Proteinfraction enthielt, wurde durch erneute Zentrifugation von restlichen Kernen befreit. Die Kerne wurden mit 500 µl Puffer P1 gewaschen und ebenfalls erneut zentrifugiert. Das Kernpellet wurde mit 300 µl hypertonischem Puffer P2 versetzt und auf einem Schüttler (100 rpm, 1,5 h, 4°C) inkubiert. Die Proteinlösungen wurden abschließend zentrifugiert (13.000 g, 15 min, 4°C). Der Überstand enthielt das Protein.

5.5 Membranprotein-Extraktion aus Zellen

5.5.1 Prinzip

Zelluläre Membranen werden zunächst mechanisch fragmentiert. Die Membranfragmente können danach durch Ultrazentrifugation bei 29.000 g auf dem Boden eines Zentrifugenröhrchens gesammelt werden. Die anschließende Aufnahme des Pellets in Puffer mit Detergenzien dient der Freisetzung der Membranproteine.

5.5.2 Lösungen für die Membranprotein-Extraktion

Homogenisierungspuffer ohne Detergenzien pH 7,5

Natriumphosphat	20mM
DTT	1mM
Complete mit EDTA	1x

Homogenisierungspuffer mit Detergenzien pH 7,5

Homogenisierungspuffer ohne Detergenzien mit zusätzlich:

Igepal CA-630	1%
Natrium Deoxycholot	0,5%
SDS	0,1%

5.5.3 Durchführung

Alle Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Es wurden jeweils zwei konfluente 150 cm² große Zellkulturflaschen verwendet. Nach Absaugen des Mediums und Spülen mit PBS

wurden die Zellen abgeschabt und in 15 ml PBS aufgenommen. Zellen wurden durch Zentrifugation (850 g, 5 min, 4°C) am Boden eines Zentrifugenröhrchens gesammelt. Die Zellen wurden in 1ml Homogenisierungspuffer ohne Detergenzien resuspendiert, 5 bis 10 min inkubiert und dann viermal mittels Glas-Teflon-Homogenisator bei 800 rpm im Eisbad vollständig homogenisiert. Zwischen den einzelnen Homogenisierungsschritten wurden die Proben je 30 s lang auf Eis gelagert. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt (2.900 g, 20 min, 4°C) zum Entfernen der Kerne aus dem Überstand. Aus dem Überstand wurden Membranfragmente durch Zentrifugation (29.000 g, 45 min, 4°C) gesammelt und anschließend im 10-fachen Volumen detergenzienhaltigen Homogenisierungspuffers resuspendiert. Die Lösung wurde abschließend zentrifugiert (15.000 g, 20 min, 4°C), Membranproteine blieben gelöst.

5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung, der nach den oben beschriebenen Verfahren gewonnenen Proteine, erfolgte mit Hilfe des DC (*detergent compatible*) Protein Assays. Es handelt sich um die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration in Anlehnung an die Bestimmung nach Lowry [128]. Unter alkalischen Bedingungen binden Kupferionen an die Peptidbindungen, Folin wird reduziert, es kommt zu einer messbaren Blaufärbung. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. Parallel zu den Proben wurden Lösungen mit definierten BSA-Konzentrationen (Proteinstandards von 0 bis 3 mg/ml) im gleichen Puffer gemessen. Die Extinktionsmessung erfolgte mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 750 nm. Mit dem Programm Revelation wurden anhand der Proteinstandards Extinktion-Konzentration-Kurven erstellt und die Messwerte der Proben unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung ausgewertet.

5.7 Western Blot

5.7.1 Prinzip

Im Western Blot werden Proteine nachgewiesen, die zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und dann auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Nach Blockieren unspezifischer Bindungen wird die Membran mit einem Primärantikörper inkubiert, der an das zu detektierende Protein binden kann. An den Primärantikörper kann ein

Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper spezifisch binden. Peroxidase setzt in der Detektionsreaktion ein Substrat um, dessen Lumineszenz einen Fotofilm belichtet.

5.7.2 Lösungen für den Western Blot

Trenngel (15 ml für 2 Gele)	7,5%iges Gel	10%iges Gel	
Aqua dest.	7,43 ml	6,18 ml	
Acrylamid/ Bisacrylamid (30/0,8)	3,75 ml	5 ml	
1,5 M Tris pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	
20%iges SDS	75 µl	75 µl	
10%iges APS	150 µl	150 µl	
TEMED	15 µl	15 µl	
Sammelgel (5 ml für 2 Gele)	5%iges Gel		
Aqua dest.	2,89 ml		
Acrylamid/ Bisacrylamid (30/0,8)	835 µl		
0,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml		
20%iges SDS	25 µl		
10%iges APS	50 µl		
TEMED	5 µl		
4 x Probenpuffer nach Laemmli pH 7		25x Laufpuffer nach Laemmli pH 8,3	
Tris	250 mM	Tris	25 mM
Glycerol (pH 6,75)	40%	Glycin	192 mM
SDS	8%	SDS	0,1%
β-Mercaptoethanol	20%		
Bromphenolblau	0,006%		
5 x Transferpuffer ohne Methanol pH 8,3		1 x Transferpuffer mit 10% Methanol	
Tris	125 mM	wird jeweils frisch aus 5 x Transfer-	
Glycin	750 mM	puffer angesetzt (150 ml für 2 Gele)	
10x TBS pH 7,5			
Tris	200 mM		
NaCl	1,5 M		

5.7.3 Durchführung

5.7.3.1 Vorbereitungen

Die verwendeten Glasplatten wurden zunächst chemisch-mechanisch mittels Seifenwasser und Bürste gereinigt und danach mit Natronlauge, destilliertem Wasser und schließlich 70%igem Ethanol abgespült. Die Gelkassette bestand aus einer 8 x 10 cm und einer 7 x 10 cm großen Glasplatte, dazwischen befand sich an beiden Seiten je ein 0,75 mm dicker und 1 cm breiter Platzhalter (*Spacer*). Die Kassette wurde mittels Schrauben an der Halterung fixiert und in eine Vorrichtung gestellt, in der das Gel zwischen die beiden Platten gegossen wurde. Zur Auftrennung der Transkriptionsfaktoren wurde ein 10%iges, für das höhermolekulare ECE-1 ein

7,5%iges Trenngel verwendet. Um eine gleichmäßige Gelkante zu erhalten, wurde sofort vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Wasser mit Hilfe eines Filterpapiers abgesaugt und darüber das 5%ige Sammelgel gegossen, in das ein Kamm mit 10 Zinken geschoben wurde. Pro Geltasche wurden 20 µg Gesamt- oder fraktioniertes Protein bzw. 11 µg Membranprotein und für den ECE-1 Nachweis 100 µg Gesamtprotein in einem Volumen von 15 µl Puffer aufgenommen und mit 5 µl 4x Probenpuffer nach Laemmli versetzt. Vor Beladen des Gels wurden die Proben denaturiert (3 min, 95°C).

5.7.3.2 Elektrophoretische Auftrennung

Die Gelkassette wurde in die Mini Protean II Elektrophoresekammer eingesetzt. Sowohl die innere als auch die äußere Kammer wurden mit Laufpuffer nach Laemmli gefüllt. Nachdem die Geltaschen mit Hilfe einer Spritze gründlich gespült worden waren, um eventuelle Gelreste zu entfernen, wurden die Proben in die Geltaschen eingefüllt. Als Molekulargewichts-Marker dienten 5 µl eines vorgefärbten Proteinstandards (Bench Mark Prestained Protein Ladder). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V und dauerte ca. 90 min.

5.7.3.3 Blot Transfer

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran wird als Blot Transfer bezeichnet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gelsandwich auseinandergelöst und das Sammelgel abgetrennt. Das Gel, die benötigten Whatman-Filterpapiere der Größe 7 cm x 9 cm x 3 mm sowie eine Nitrozellulosemembran der Größe 7 x 9 cm wurden für 15 min in 1 x Transferpuffer gelegt. Es wurde die Fast Blot B43 Transferkammer zur Durchführung eines Semi-Dry-Blots verwendet. Die Elektroden der Transferkammer wurden vor jedem Transfer mit 70% Ethanol gereinigt. Auf die sich unten befindende Anode wurden 5 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, wobei möglichst alle Luftblasen dazwischen beseitigt wurden. Ebenfalls luftblasenfrei wurden darüber die Nitrozellulosemembran, das Gel sowie weitere 5 Filterpapiere gestapelt. Der Deckel wurde geschlossen und mit 1 kg Gewicht beschwert. Zur Kühlung diente eine Wasserzirkulation. Es wurden 3 mA Strom pro 1 cm² Membran angeschlossen und 40 min transferiert.

5.7.3.4 Färbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau S

Nach kurzem Spülen der Membran in destilliertem Wasser wurden die Proteine auf der Membran durch 3 min Inkubation mit Ponceau S angefärbt. Dies diente der Überprüfung der Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung und des Transfers. Zur Dokumentation wurden die Membranen eingescannt.

5.7.3.5 Blockierung unspezifischer Bindungen

Um unspezifische Bindungen der Antikörper auf der Membran zu verhindern, wurde diese mit 6% (W/V) Milchpulver (Blotting Grade Non Fat Dry Milk) in 1 x TBS auf dem Schüttler inkubiert (80 rpm, über Nacht, 4°C).

5.7.3.6 Waschen

Bei jedem Waschschrift wurde die Membran dreimal in 1 x TBS mit 1% Tween 20 und anschließend dreimal in 1 x TBS auf dem Schüttler (80 rpm, je 5 min, RT) gewaschen.

5.7.3.7 Inkubation mit dem Primärantikörper

Die Primärantikörper binden an das zu detektierende Protein auf der Membran. Sie wurden in 5 ml 3% (W/V) Milchpulver in 1 x TBS, wie in Tab. 2 angegeben, verdünnt. Die Inkubation erfolgte auf dem Schüttler (80 rpm) für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. bei Verwendung des ECE-1 Antikörpers über Nacht bei 4°C. Der gegen die katalytische Domäne aller bekannten humanen ECE-1 Isoformen gerichtete polyklonale Antikörper „Antiserum 29“ [129] wurde uns freundlicherweise von Dr. L. Muller, Paris, Frankreich, zur Verfügung gestellt.

Tab. 2 Verwendete Primärantikörper

Zielepitop	Bestellnummer	Verdünnung	Spezies
E2F-1 (C-20)	sc-193x	1:5.000	Kaninchen
E2F-2 (C-20)	sc-633x	1:5.000	Kaninchen
E2F-3 (C-18)	sc-878x	1:5.000	Kaninchen
GATA-2 (CG2-96)	sc-267x	1:2.000	Maus
GATA-3 (HG3-31)	sc-268x	1:2.000	Maus
CBF-A (FL-207)	sc-13045x	1:3.333	Kaninchen
ECE-1 „Antiserum 29“		4µl/ 5ml	Kaninchen

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte ein Waschschrift.

5.7.3.8 Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Der Sekundärantikörper ist gegen den Spezies-spezifischen konstanten Teil des Primärantikörpers gerichtet. Die Spezies der einzelnen Primärantikörper geht aus Tab. 2 hervor. Anti-Maus-Antikörper (Bestellnummer sc-2005) wurde 1:2.000 und Anti-Kaninchen-Antikörper (Calbiochem Bestellnummer 401315) 1:10.000 in 5 ml 3% (W/V) Milchpulver in 1 x TBS verdünnt. Nach Inkubation auf dem Schüttler (80 rpm, 1 h, RT) erfolgte ein Waschschrift.

5.7.3.9 Detektionsreaktion

Die Nitrozellulosemembran wurde gleichmäßig mit einer 1:1 Mischung der Reagenzien A und B (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate) benetzt und inkubiert, wie vom Hersteller beschrieben. Um die Lumineszenz abbilden zu können, wurde ein Film (Hyperfilm MP) in einer Röntgenkassette belichtet. Entwickelt wurden die exponierten Filme in einem automatischen System für Röntgenfilme.

5.7.3.10 Detektion von β -Aktin

Die Detektion von β -Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts jeder Zelle diene als Kontrolle für die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung bzw. zur Standardisierung des ECE-1 Signals. An den eingesetzten Antikörper (sc-1615 HRP) ist die Peroxidase direkt gekoppelt. Die Inkubation erfolgte wie für die Sekundärantikörper angegeben, wobei der Antikörper 1:1.000 verdünnt wurde.

5.7.3.11 Spezifitätskontrolle des Anti-E2F-2 Antikörpers mit *Blocking Peptide*

Ob detektierte Banden durch spezifische Bindung des variablen Teils des Antikörpers oder durch unspezifische Bindung hervorgerufen werden, kann mit Hilfe eines sog. *Blocking Peptide* ermittelt werden. Das zu untersuchende Protein wird dabei im Überschuss zu der Lösung mit dem Primärantikörper zugegeben, es erfolgt eine Präadsorption des Antikörpers, so dass die spezifische Detektion des auf der Nitrozellulosemembran fixierten Proteins abgeschwächt wird oder ausbleibt. Aussagen über die Spezifität lassen sich durch Vergleich der Bandenmuster mit und ohne Verwendung des *Blocking Peptide* treffen. 4 μ g Anti-E2F-2 Antikörper wurden in 50 μ l 3% Milchpulver in TBS verdünnt und auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. In ein Gefäß wurden 20 μ g E2F-2 *Blocking Peptide* zugegeben. Beide Gefäße wurden mit 3% Milchpulver in TBS auf ein Volumen von 125 μ l gebracht und inkubiert (1 h bei 37°C,

anschließend über Nacht bei 4°C). Eine Zentrifugation (13.000g, 15 min, 4°C) diente der Entfernung entstandener Immunkomplexe. Je 110 µl der beiden Antikörperlösungen wurden in 10 ml 3% Milchpulver in TBS aufgenommen und parallel eingesetzt.

5.7.3.12 Bestimmung der relativen ECE-1 Expression

Um die Expression von ECE-1 in den Hirntumoren zu vergleichen, wurden die Western Blots mit einem Durchlichtscanner eingescannt und die Intensität der ECE-1 Signale mit dem Programm TINA 2.09g quantifiziert. Die jeweiligen Werte wurden in Bezug zur Stärke des β-Aktinsignals gesetzt. Um Proben auf unterschiedlichen Blots miteinander vergleichen zu können, wurde auf jedem Blot ein bestimmtes Tumor-Proteinextrakt als „Referenztumor“ mitbestimmt. Dieser wurde ebenfalls auf β-Aktin standardisiert. Die relative ECE-1 Expression jedes Tumors ergibt sich dabei wie folgt:

$$\text{ECE-1 rel (Tumor)} = \frac{\text{ECE-1 (Tumor) / } \beta\text{-Aktin (Tumor)}}{\text{ECE-1 (Referenztumor) / } \beta\text{-Aktin (Referenztumor)}}$$

5.8 Immunzytologie

5.8.1 Prinzip

Auf Objektträgern können adhärent wachsende Zellen auf die Expression und subzelluläre Lokalisation von Proteinen untersucht werden. Nach Fixation und Permeabilisation der Membranen erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper, der ein bestimmtes Protein erkennt. Der anschließend eingesetzte, in diesem Fall FITC-konjugierte Sekundärantikörper, bindet spezifisch an den Primärantikörper und erlaubt die Detektion im Fluoreszenzmikroskop.

5.8.2 Durchführung

Auf einem 8-Loch Objektträger wurden 3.000 Zellen in 60 µl Medium pro Loch ausgesät und 48 Stunden im Zellinkubator inkubiert. Die Zellen wurden mit 3% Paraformaldehyd in PBS (2 min, RT) fixiert. Vor und nach der Fixierung wurden sie jeweils dreimal mit PBS gespült. Permeabilisiert wurden die Zellen durch zweiminütige Inkubation mit 0,4% Igepal (CA-630) in PBS bei RT. Unspezifische Bindungen wurden durch Blocken mit 3% BSA in PBS (1 h, RT) verhindert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tab. 2) erfolgte in einem Volumen von 20 µl 3% BSA in PBS pro Loch (1 h, RT). Sie wurden in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde einheitlich

der Anti-Kaninchen-Antikörper (sc-2090) in einer Verdünnung von 1:200 in 3% BSA in PBS eingesetzt. Die einstündige Inkubation erfolgte bei RT. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit dem Sekundärantikörper alleine (ohne Primärantikörper), um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen. Die Zellen wurden auf dem Objektträger in Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop (FITC Filter).

5.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

5.9.1 Prinzip

Mit dem EMSA, auch *Gel shift* oder *Band shift* genannt, lässt sich die spezifische Wechselwirkung zwischen einem DNA-bindenden Protein oder Proteinkomplex, z.B. einem Transkriptionsfaktor in einem nukleären Proteinextrakt und einer DNA-Sequenz, z.B. einem Oligodesoxynukleotid (ODN), sichtbar machen. Das DNA-Molekül wird dabei radioaktiv markiert. Nach Inkubation des ODN mit dem DNA-bindenden Protein wird das Reaktionsgemisch in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bilden sich Komplexe zwischen markiertem ODN und Protein, laufen diese langsamer als freies ODN. Die Banden sind durch Exposition von Film oder speziellen Detektionsplatten darstellbar. Zugegebenes nichtmarkiertes ODN im Überschuss kann mit dem radioaktiv markierten ODN um die Bindung an das Protein kompetieren, dadurch verschwinden die spezifischen Banden. Im Supershift Assay kann ein interagierendes Protein durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden. Bindet der Antikörper an den Protein-DNA Komplex, wird dieser noch stärker im Gel retardiert (*Supershift*).

5.9.2 Lösungen für den EMSA

5 x Tris-Glycin-Puffer

Tris	250 mM
Glycin	2 M
Na ₂ EDTA	10 mM

1 x Tris-Glycin-Gel (4%Polyacrylamid)

50 ml für ein Gel pH 8

Substanz	Volumen
Aqua dest.	35 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid (40/2)	5 ml
5 x Tris-Glycin-Puffer	10 ml
APS 10%ig	250 µl
TEMED	50 µl

0,5 x TBE- Gel (4%Polyacrylamid)

50 ml für ein Gel

Substanz	Volumen
Aqua dest.	20 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid (40/2)	5 ml
1 x TBE	25 ml
APS 10%ig	250 µl
TEMED	50 µl

5 x Bindungspuffer pH 7,5

Tris-Base	50 mM
Na ₂ EDTA	5 mM
KCl	1,5 M
Glycerol	25%

Gel-Ladepuffer

Glycerol	50%
Bromphenolblau/ Xylencyanol	0,05%

5.9.3 Durchführung**5.9.3.1 Vorbereitungen**

Zunächst wurden die verwendeten Oligodesoxynukleotide renaturiert, um doppelsträngige ODN zu erhalten. *Sense* und *antisense* ODN wurden in einer Konzentration von jeweils 50 µM eingesetzt und 3 min in kochendem Wasserbad vollständig denaturiert. Die Renaturierung erfolgte durch langsames Abkühlen auf RT. Die Konzentration der DNA-Doppelstränge betrug am Ende 50 µM. Sämtliche verwendeten ODN wurden von Proligo, Paris, Frankreich synthetisiert (siehe Tab.3).

Tab. 3 Verwendete Oligonukleotide

Name des ODNs	Sequenz
ECE-1c -154 (WT)	5'-CGGCACTCGGCGCCGAAGCCGCGAG-3'
ECE-1c -154 (Mut 2)	5'-CGGCACTCGGT ACC GAAGCCGCGAG-3'
ECE-1c -154 (Mut 1)	5'-CGGCACTCGGT TCC GAAGCCGCGAG-3'
ECE-1b -338A	5'-GCTCTGGG CCA AATCGAGGGGCACCT-3'
ECE-1b -338C	5'-GCTCTGGG CCAC ATCGAGGGGCACCT-3'
ECE-1c -226	5'-AGGCCGTGATTGGCTGCGCCAC-3'

Angegeben ist jeweils die Sequenz des *sense* Strangs. Der Name der ODN setzt sich zusammen aus dem isoformspezifischen ECE-1 Promotor, dem Abstand des mittleren Nukleotids zum Start-Codon (ATG). WT steht für Wildtyp-Sequenz; Mut 1 und Mut 2 für Mutationen der Basen bei -156 bp bzw. -157 bp, die fett dargestellt sind; A bzw. C beschreiben die Base des SNP bei-338 bp im ECE-1b Promotor

Die Glasplatten wurden vor Verwendung gründlich gereinigt (vgl. 5.7.3.1). Zwischen die zwei Platten (19 cm x 16,5 cm und 17,5 cm x 19,5 cm) wurde ein 1 mm dicker Platzhalter platziert. Klammern am seitlichen Rand und Paketklebeband am unteren Rand hielten das System zusammen und dichteten es ab. Das verwendete nicht-denaturierende 4%ige Polyacrylamid-Gel in 1x Tris-Glycin Puffer bzw. 0,5x TBE-Puffer für ODN ECE-1c -226 wurde zwischen die Platten gegossen und polymerisierte bei RT. Zu analysierende Proteinfractionen wurden mit je 6 µg Antikörper (für den *Supershift*) bzw. 50 pmol Kompetitor-ODN in einem Volumen von 15 µl inkubiert (1 h, RT).

5.9.3.2 Kinasierungsreaktion

Diese Reaktion dient der radioaktiven Markierung der ODN am 5' Ende.

Kinasierungsreaktion

ODN	1 pmol
T4-Kinase Puffer	1 x
T4-Kinase	12,5 U
γ - ³² P ATP	25 μ Ci
Aqua dest.	ad 25 μ l

Die einstündige Kinasierung erfolgte bei 37°C. Die T4-Kinase wurde am Ende der Reaktion inaktiviert (10 min, 65°C). Die Aufreinigung der markierten ODN erfolgte mit Hilfe von MicroSpin G-25 Columns, wie vom Hersteller angegeben. Die Messung der Radioaktivität aufgereinigter ODN erfolgte im β - Szintillationszähler.

5.9.3.3 Bindungsreaktion und Gellauf

Zu jedem Probenansatz von 15 μ l wurden 10 μ l des folgenden Mastermixes zugefügt.

Mastermix

Poly[d(I-C)]	2 μ g pro Ansatz
DTT	2,5 mM
MgCl ₂	2,5 mM
Bindungspuffer	2,5 x Puffer
ODN	60.000 cpm pro Ansatz
Aqua dest.	ad 10 μ l pro Ansatz

Die Bindungsreaktion erfolgte über Nacht bei 4°C. Zu jeder Probe wurden dann 5 μ l Gelladepuffer zugegeben. Entsprechend dem verwendeten Gel wurden als Laufpuffer 0,5 x TBE- bzw. 1 x Tris-Glycin-Puffer eingesetzt. Die Geltaschen wurden mittels einer Spritze mit dem Laufpuffer gespült. Nach einem Vorlauf von 30 min bei 15 mA pro Gel wurden die Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung dauerte 4,5 h und erfolgte bei RT (1 x Tris-Glycin-Gel) bzw. 4°C (0,5 x TBE-Gel). Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel auf 3 mm dickes Whatman-Filterpapier übertragen und doppelt in Saran-Folie eingepackt. Es erfolgte die Belichtung einer *Imaging Plate* über vier Tage bei -20°C. Das Auslesen der Signale erfolgte im *Imaging Plate Reader*.

5.10 Southwestern Blot

5.10.1 Prinzip

Elektrophoretisch aufgetrennte und auf eine Nitrozellulosemembran transferierte Proteine werden auf ihre Affinität zu radioaktiv markierten doppelsträngigen ODN untersucht. Der Vergleich mit einem Molekulargewichts-Marker erlaubt die Bestimmung

des Molekulargewichts des mit dem ODN interagierenden Proteins. Anschließend können auf derselben Membran Proteine analog zum Western Blot mit Antikörpern detektiert werden. Molekulargewichte dieser Proteine können mit denen des DNA-Bindungspartners verglichen werden. Anders als beim EMSA werden beim Southwestern Blot die Proteine zunächst denaturiert und reduziert und damit ggf. aus Protein-Komplexen befreit bzw. monomerisiert.

5.10.2 Lösung für den Southwestern Blot

TNED Puffer pH 7,5

Tris	10 mM
NaCl	50 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	1 mM

5.10.3 Durchführung

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine und der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgten wie für den Western Blot beschrieben. Der einzige Unterschied bestand in der größeren eingesetzten Proteinmenge von 47 µg, die ein 1,5 mm dickes Gel erforderlich machte. Unspezifische Proteinbindungen auf der Nitrozellulosemembran wurden durch Inkubation mit 6% Milchpulver in TBS (über Nacht bei 4°C) blockiert. Die Membran wurde zweimal in TBS mit 1% Tween, dann dreimal mit TNED Puffer je 10 min gewaschen. Das eingesetzte doppelsträngige ODN [ECE-1c -154 (WT)] wurde mittels Kinasierungsreaktion radioaktiv markiert, wie für den EMSA beschrieben. Die Membran wurde mit in TNED Puffer verdünntem ODN mit einer Aktivität von 430.000 cpm/ml inkubiert (über Nacht bei RT), anschließend dreimal in TNED Puffer gewaschen, in Saran-Folie eingepackt und auf eine *Imaging Plate* gelegt. Die *Imaging Plate* wurde drei Tage lang bei -20°C exponiert und anschließend ausgelesen. Die Protein-Detektion erfolgte nach dem Waschen (dreimal mit TBS und dreimal mit TBS mit 1% Tween) auf derselben Membran durch Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper wie beim Western Blot.

5.11 Reporteragen Assay

5.11.1 Prinzip

Um die Aktivität von Promotoren in eukaryontischen Zellen zu bestimmen, können Reporteragenkonstrukte eingesetzt werden. Dabei wird der zu untersuchende Promotor so in einen Vektor (z.B. pGL3 basic Vektor) kloniert, so dass er die Expression eines

Reporter gens, z.B. Luziferase (aus *Photinus pyralis*, dem Glühwürmchen, auch *firefly*-Luziferase genannt) regulieren kann. Das Produkt des Reporter gens katalysiert eine quantifizierbare Reaktion und macht damit die Promotoraktivität messbar. Die Reporter genkonstrukte werden transient in Zellen transfiziert, in denen das Reporter gen exprimiert werden kann. Nach der Lyse der Zellen wird die Aktivität der Luziferase gemessen. Um Promotoraktivitäten verschiedener Konstrukte miteinander zu vergleichen, wird zur Standardisierung ein Vektor in konstanter Menge kotransfiziert, der z.B. eine andere Luziferase (aus *Renilla reniformis*, auch *renilla*-Luziferase genannt) exprimiert. Um die Hintergrundaktivität des Reporter gens zu ermitteln, wird parallel der promotorlose pGL3 basic Vektor „pGL3 basic (leer)“ transfiziert.

5.11.2 Reporter genkonstrukte

Es wurden bereits vorhandene Reporter genkonstrukte verwendet, wobei die zu untersuchenden Promotoren in den pGL3 basic Vektor kloniert (ECE-1c Promotor: 490 bp 5' des ATG, Wildtyp-Sequenz („WT“) oder mutiert (analog ODN „ECE-1c -154 (Mut 1)“ worden waren (siehe Tab. 3). Als Positivkontrolle diente der pGL3 basic Vektor mit dem viralen SV40 Promotor „pGL3 basic (SV40)“. Tab. 4 gibt eine Übersicht über eingesetzte Konstrukte. Mutationen wurden über eine PCR-basierte Methode in die genomische Sequenz eingefügt [130] wie an anderer Stelle beschrieben [131].

Tab.4 Reporter genkonstrukte

Bezeichnung des Konstrukts

Insertion

pGL3 basic (ECE-1c WT)

ECE-1c Promotors mit Wildtyp-Sequenz „WT“

pGL3 basic (ECE-1c Mut 1)

Mutierter ECE-1c Promotor

pGL3 basic (SV40)

SV40 Promotor

pGL3 basic (leer)

-

5.11.3 Klonierung von Expressionsvektoren für E2F-1 und E2F-2

Humanes E2F-1 bzw. E2F-2 wurde mit in Tab. 5 genannten Primern in den Vektor pCEP4 kloniert. Dabei wurde der gesamte offene Leserahmen der beiden Transkriptionsfaktoren einschließlich der sog. Kozak-Sequenz (jeweils 1322 bp) berücksichtigt. Als Matrize für die PCR wurde cDNA aus humanen Kelly Zellen verwendet. Die eingesetzten Primer wurden für die Klonierung in pCEP4 zusätzlich mit Schnittstellen für NheI bzw. BamHI versehen. Die fertigen Konstrukte wurden in *Escherichia coli* (DH5 α) transformiert und die Bakterien amplifiziert. Die Plasmid-DNA wurde mittels Plasmid Maxi Kit, wie vom Hersteller beschrieben, extrahiert. Durch DNA-

Sequenzierung wurden die Konstrukte auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt.

Tab. 5 Eingesetzte Primer

Primernamen	Schnittstelle	Sequenz
E2F2 sense	NheI	5'-ATCTCGCTAGCCGCTATGCTGCAAGGGCCC-3'
E2F2 antisense	BamHI	5'-GATCTGGATCCCCACTCAATTAATCAACAGGTC-3'
E2F1 sense	NheI	5'-ATCTCGCTAGCCGTCATGGCCTTGGCCGGG-3'
E2F1 antisense	BamHI	5'-GATCTGGATCCCCTGTCAGAAATCCAGGGGG-3'

5.11.4 Transiente Transfektion

5.11.4.1 Prinzip

Um die Aktivität der Promotoren in den Reporter-genkonstrukten in eukaryontischen Zellen zu bestimmen, wurden sie mittels FuGENE-6 in Zellen transfiziert. Lipid-Plasmid-Komplexe fusionieren dabei mit der Zellmembran und die DNA wird in die Zelle aufgenommen. Durch Kernporen gelangt sie weiter in den Zellkern, wo ggf. das Luziferase-Gen unter Kontrolle des vorgeschalteten Promotors transkribiert wird. Um den Effekt der Transkriptionsfaktoren E2F-1 und E2F-2 auf die Promotoraktivität zu untersuchen, wurden die Expressionsvektoren gemeinsam mit den pGL3 basic Vektoren transfiziert.

5.11.4.2 Durchführung

HMEC-1 bzw. EA.hy 926 wurden in einer Konzentration von 100.000 Zellen in 2 ml Nährmedium pro Loch einer 12-Lochplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium durch 1 ml OPTIMEM ohne Zusätze ersetzt. Bei der nun folgenden eigentlichen Transfektion wurden pro Loch 50 µl Transfektionslösung zugegeben.

Transfektionslösung	pro Loch
FuGENE 6	1,5 µl
Promotor-Luziferase-Konstrukt im pGL3 basic Vektor	0,4 µg
phRL-null (Renilla)	0,05 µg
OPTIMEM- Medium	ad 50 µl

Zunächst wurde vorher erwärmtem OPTIMEM das FuGENE 6 zugesetzt und 5 min bei RT inkubiert. Für jeden Ansatz wurde das Plasmidgemisch in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und tropfenweise das Medium/ FuGENE 6 Gemisch zugegeben und erneut inkubiert (15 min, RT). Danach wurden 50 µl des Gemisches in jedes Loch pipettiert.

Jeder Ansatz erfolgte in vier Replikaten. Nach der Transfektion wurden die Zellen 48 Stunden im Zellinkubator inkubiert.

5.11.5 Bestimmung der Luziferaseaktivität und Berechnung der relativen Luziferaseaktivität

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte nach dem Absaugen des PBS die Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl *Passive Lysis Buffer* pro Loch einer 12-Loch Platte. Nach Inkubation auf einem Schüttler (15 min, 80 rpm, RT) wurden die Zellen bei -80°C über Nacht eingefroren, um diese komplett zu lysieren. Für die eigentliche Bestimmung der Luziferaseaktivität wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System, wie vom Hersteller angegeben, verwendet. Die Messung erfolgte im Luminometer. Es wurden jeweils 20 µl Zell-Lysat eingesetzt. Die Messzeit der Reporter-Gen-Aktivitäten betrug jeweils 10 s. Zum Vergleich der Aktivitäten verschiedener Promotoren wurde die relative Luziferaseaktivität (RLA) berechnet. Die RLA ist das Verhältnis der *firefly*-Luziferaseaktivität „LucF“ des jeweiligen Reporter-Genkonstrukts zu der Aktivität einer kotransfizierten *renilla*-Luziferase „LucR“ in Bezug zum Verhältnis der *firefly*-Luziferaseaktivität des promotorlosen pGL3 basic Vektors (pGL3 basic leer) zu der kotransfizierten *renilla*-Luziferaseaktivität.

$$RLA_n = \frac{\text{LucF}(n) / \text{LucR}(n)}{\text{LucF}(\text{pGL3 basic leer}) / \text{LucR}(\text{pGL3 basic leer})}$$

5.12 Reagenzien, Geräten und Materialien

Reagenzien und Materialien	Hersteller
8-Loch Objektträger (OT) Standard-Epoxy, 6 mm	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
12-Lochplatten	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland
Acrylamid/ Bisacrylamid (30/0,8) = rotiphorese 30	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/ Bisacrylamid (40/2) = rotiphorese 40	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper gegen: Aktin, CBF-A, E2F-1, E2F-2, E2F-3, GATA-2, GATA-3, Anti-Maus- und Anti- Kaninchen-Antikörper	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
Anti-Kaninchen Antikörper	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

BamHI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Bench Mark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Blotting Grade Non Fat Dry Milk	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Cell Scraper 32 cm	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Complete mit EDTA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
DH5 α (Escherichia coli)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
DTT	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
E2F-2 Blocking Peptide sc-633P	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
EGF	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Filterpapier (Whatman)	Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland
FuGENE 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
γ ³² P ATP	GE Healthcare - Amersham Biosciences, München, Deutschland
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Glasschälchen (Färbeträge)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Glycerol (Glycerin)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
HAT	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HCl 1 M	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hydrocortisonlösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Hyperfilm MP	GE Healthcare - Amersham Biosciences, München, Deutschland
Igepal (CA-630)	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MCDB 131	Gibco - Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
MEM – EARLE 10x	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Microcon Microconcentrators-100 YM-100	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
MicroSpin G-25 Columns	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg, Deutschland
Mikrotiterplatte (Deckel)	Nunc GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Mowiol	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbicarbonat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
NaOH 1 M	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Natriumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium Deoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
NEAA (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
NheI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
OPTIMEM	Gibco - Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Passive Lysis buffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
PBS - Dulbecco w/o Ca, Mg	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Poly[d(I-C)]	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Protran Nitrozellulose	Schleicher & Schüll BioScience GmbH Dassel, Deutschland
Transfermembran BA 85	
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
Renilla R₀ Vektor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Röntgenkassette BAS 2040	Fujifilm, Tokyo, Japan
RPMI 1640 ohne Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Saran-Folie	Dow Chemical Company
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpell	Feather Safty Razor Co.
SuperSignal® West Pico	Pierce, Rockford, IL, USA
Chemiluminescent Substrate	
T4 Kinase Puffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
T4 Polynukleotid Kinase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
TBE 10 x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland
TRIZOL Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin Versene	Gibco - Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Filter	Nunc GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland

Geräte und PC-Programme	Hersteller
β-Szintillationszähler 1219 Rackbeta	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer MiniProtean II für Western Blot	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Elektrophoresekammer für EMSA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
ELISA-Reader MRX	DYNEX Technologies, Denkendorf, Deutschland
Fast Blot B43 Transfer Kammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss GmbH, Göttingen, Deutschland
Glas-Teflon-Homogenisator/ Potter S	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Imaging Plate Reader BAS-1500	Fujifilm, Vertrieb über Raytest Isotopenmessgerät GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Imaging Plate BAS-MS2040	Fujifilm, Tokyo, Japan
Luminometer Lumat LB 9501	Berthold GnbH & Co KG, Bad Wildbad, Deutschland
pH-Meter Calimatic 761	Knick GmbH & Co, Berlin, Deutschland
Schüttler Pormax 2020	Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Kelheim, Deutschland
Spannungsquelle	BioRad, Hercules, CA, USA MJ Research Inc. USA, über Biozym Diagnostik
Thermal-Cycler, PTC-100	GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
TINA 2.09g	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
UV-1202 Photometer	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
Wasserbad	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellinkubator	Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland
Mikrozentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

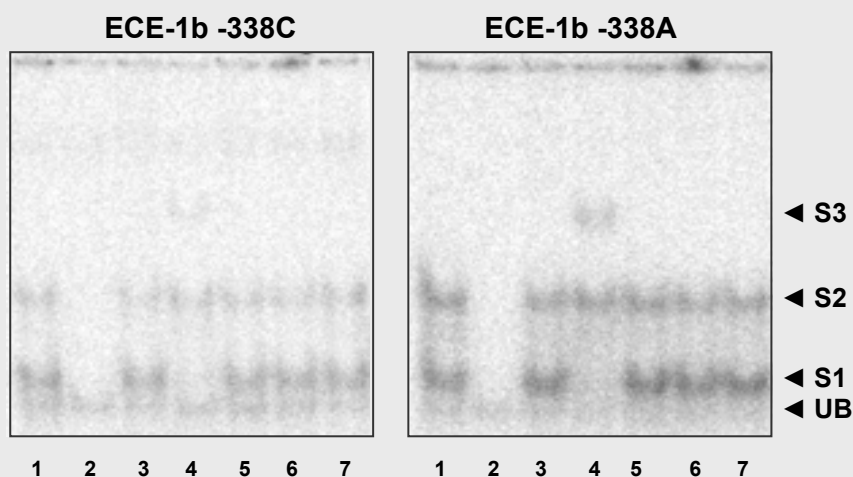
6 ERGEBNISSE

6.1 Identifizierung funktioneller Elemente in den ECE-1 Promotoren

6.1.1 E2F-2 interagiert mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor

Im ECE-1b Promotor befindet sich an Position -338 bp (5' des ATG) ein natürlicher Polymorphismus (SNP), der ein Bindungsmotiv für den Transkriptionsfaktor E2F verändert. Wir konnten zeigen, dass E2F-2 aus SK-N-MC Neuroblastomzellen (Abb. 5) und Glioblastomgewebe (nicht gezeigt) spezifisch mit den E2F-Bindungsmotiven in den beiden Allelen (-338A und -338C) im Supershift-Assay interagierte.

Abb. 5 EMSA - Interaktion zwischen nuklärem E2F-2 aus Neuroblastomzellen (SK-N-MC) mit dem polymorphen E2F Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor



Die linke Autoradiographie zeigt die Interaktion eines ^{32}P -markierten ODN für Allel -338C, die rechte die Interaktion mit Allel -338A.

[1] Proteinextrakt und ODN

[2] Zugabe von Kompetitor (nicht-radioaktiv markiertes ODN), der die spezifischen *Shifts* S1 und S2 kompetiert, nicht aber die unspezifische Bande (UB) verändert.

[4] Zugabe von Anti-E2F-2 Antikörper, nicht jedoch Zugabe von Anti-E2F-1 [3], Anti-E2F-3 [5], Anti-GATA-2 [6] und Anti-GATA-3 Antikörper [7] überführen den spezifischen *Shift* S1 in einen *Supershift* S3.

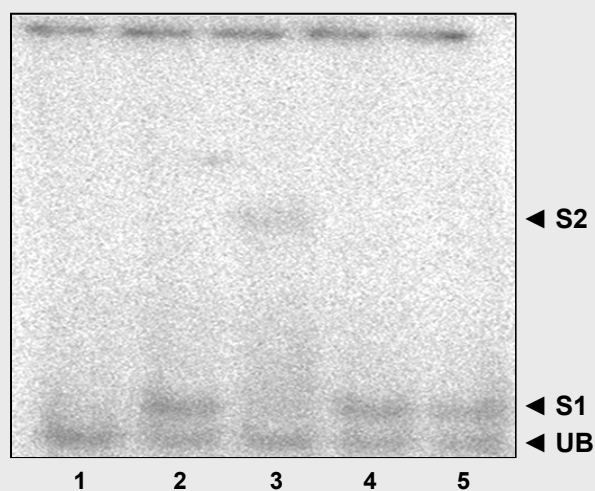
Die aus Abb. 5 ersichtlichen höheren Intensitäten des spezifischen *Shifts* S1 sowie des *Supershifts* S3 deuten auf eine höhere Bindungsaffinität von E2F-2 aus Neuroblastomzellen an das Allel -338A als an das Allel -338C hin. Eine höhere Affinität zum Allel -338A zeigte sich auch bei der Analyse von Proteinextrakten aus einem Gliosarkom (Abb. 10), einem Meningeom (Abb. 11) sowie einem Glioblastom (nicht gezeigt).

6.1.2 Protein-DNA-Interaktionen im ECE-1c Promotor

6.1.2.1 E2F-2 interagiert mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor

Im ECE-1c Promotor befindet sich bei -154 bp ein E2F-Bindungsmotiv. Im EMSA konnte mit Proteinextrakten aus der Zelllinie Kelly (Abb. 6), einem Gliosarkom (Abb. 10), einem Meningeom (Abb. 11) sowie aus den Zelllinien U373 MG und SK-N-MC (nicht gezeigt) eine spezifische Interaktion von E2F-2 mit diesem Promotorabschnitt gezeigt werden, während E2F-1 und E2F-3 nicht interagierten.

Abb. 6 EMSA - Interaktion von E2F-2 aus Kelly-Zellen mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor



[5] nur Proteinextrakt und ODN

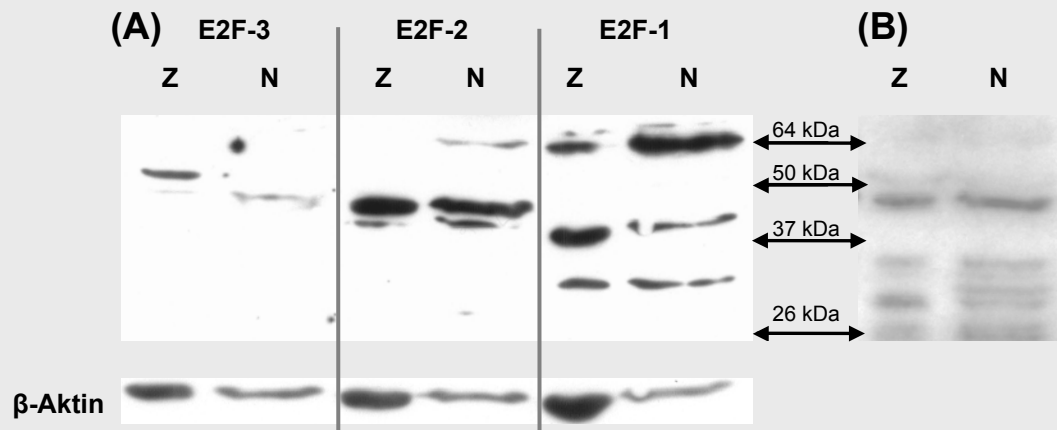
[1] Zugabe von Kompetitor (nicht-radioaktiv markiertes ODN), der den spezifischen *Shift* S1 kompetiert, nicht aber die unspezifische Bande (UB) verändert.

[3] Zugabe von Anti-E2F-2 Antikörper überführt den spezifischen *Shift* S1 komplett in einen *Supershift*.

Zugabe von Anti-E2F-1 [4] oder Anti-E2F-3 Antikörper [2] verändern den *Shift* nicht.

Bindung von E2F-2 an diesen Abschnitt des ECE-1c Promotors konnte weiterhin mit Proteinextrakten aus Meningeomgewebe (Abb. 11), EA.hy 926 (Abb. 14) und HMEC-1 (nicht gezeigt) im EMSA und *Supershift* Assay nachgewiesen werden. Die Bindungsaffinität von fraktionierten Proteinen aus U373 MG und HMEC-1 zum bereits im EMSA eingesetzten radioaktiv markierten ODN wurde zusätzlich im Southwestern Blot analysiert. Abb. 7 zeigt die Southwestern Blot Analyse mit zytosolischen und nukleären Proteinen aus U373 MG Gliomzellen.

Abb. 7 Southwestern Blot - Analyse der Bindung von E2F aus U373 MG Gliomzellen an das E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor

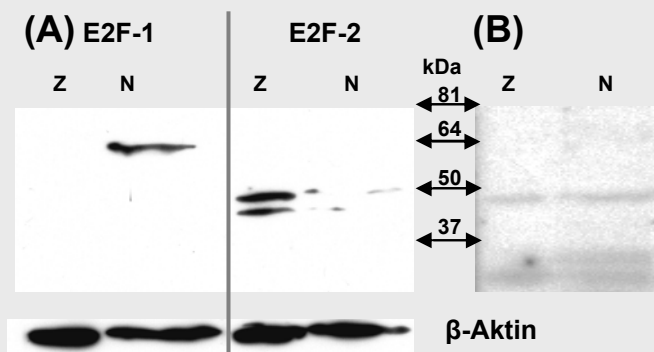


Nukleäres (N) und zytosolisches (Z) Proteinextrakt aus U373 MG wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem radioaktiv markierten ODN analog zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c-Promotor (B), anschließend auf derselben Membran der Protein-Nachweis von E2F-1, -2 und -3 (A). Unterhalb der E2F Detektion (A) ist der β -Aktin-Nachweis als Kontrolle für gleichmäßige Beladung dargestellt. Zwischen (A) und (B) ist das mittels Molekulargewicht-Marker bestimmte Molekulargewicht eingetragen. Der rechts abgebildete Teil der Membran (B) entspricht dem Abschnitt von (A), auf dem E2F-2 detektiert wurde.

Aus Abb. 7 (B) ist ersichtlich, dass das ODN analog zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor eine hohe Affinität zu einem Protein aus U373 MG aufwies, das ein Molekulargewicht von etwas unter 50 kDa hatte. Weitere schwächere Bindungen erfolgten an Proteine leichter als 37 kDa, sowohl an solche aus der zytosolischen als auch an jene aus der nukleären Fraktion. Auf derselben Membran (Abb. 7 (A) E2F-2) wurde E2F-2 detektiert, dabei waren für E2F-2 zwei Banden (ca. 50 und 48 kDa) in Kern- und Zytozolfraktion nachweisbar. Die obere der beiden Banden hatte das gleiche Molekulargewicht wie das Protein, für das eine Bindung mit dem ODN gezeigt wurde. Das Protein, das der unteren und schwächeren der beiden Banden entsprach, interagiert offenbar nicht mit dem ODN (Abb. 7 (B)). E2F-1 wurde als Protein von 64 kDa detektiert. Analog dem EMSA ließ sich jedoch keine Bindung an das ODN nachweisen. Der Anti-E2F-3 Antikörper detektierte ein sehr schwaches Signal von ca. 50 kDa. Die Übereinstimmung des Molekulargewichts der E2F-2 Bande von 50 kDa mit dem des ODN-Interaktionspartners deutete darauf hin, dass es sich dabei höchstwahrscheinlich um E2F-2 handelte. Nach dem Southwestern Blot Ergebnis alleine ist es nicht auszuschließen, dass auch E2F-3 an das ODN binden konnte. Die Interaktionspartner des ODN mit einem Molekulargewicht von unter 37 kDa konnten

nicht zugeordnet werden. Obwohl mit dem Anti-E2F-2 Antikörper zwei Signale (48 und 50 kDa) nachgewiesen wurden, band offenbar nur das schwerere Protein an das ODN. Dies traf in gleicher Weise auch für das Ergebnis der Southwestern Blot Analyse mit Proteinextrakten aus HMEC-1 zu (Abb. 8). Die auch hier bei ca. 64 kDa detektierte E2F-1 Variante hatte ebenfalls kein korrelierendes Signal in der ODN Bindungsanalyse.

Abb. 8 Southwestern Blot - Analyse der Bindung von E2F aus HMEC-1 Endothelzellen an das E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor



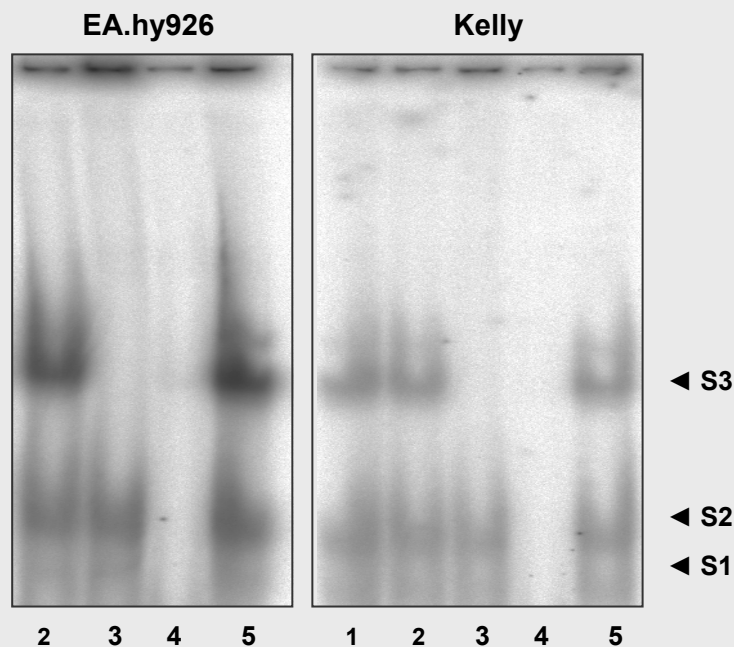
Nukleäres (N) und zytosolisches (Z) Proteinextrakt aus HMEC-1 wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem radioaktiv markierten ODN analog zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c-Promotor (B).

Anschließend erfolgte auf derselben Membran der Protein-Nachweis von E2F-1 und -2 (A) wie über der Abb. jeweils angegeben. Unten ist der β -Aktin-Nachweis als Kontrolle für gleiche Beladung und zwischen (A) und (B) ist das mittels Molekulargewicht-Marker bestimmte Molekulargewicht dargestellt. Der rechts abgebildete Teil der Membran (B) entspricht dem Abschnitt von (A), auf dem E2F-2 detektiert wurde.

6.1.2.2 Untersuchung der CCAAT-Box im ECE-1c Promotor

Im ECE-1c Promotor befindet sich bei -226 bp (5' des ATG) eine CCAAT Box, die einem CBF-Bindungsmotiv entspricht und mit einer potentiellen GATA-Bindungsstelle überlappt. Im EMSA konnte gezeigt werden, dass CBF aus nukleärem Extrakt neuroblastärer Kelly (Abb. 9) sowie SK-N-MC Zellen (nicht dargestellt) spezifisch mit diesem Promotorabschnitt interagiert. Die spezifische Interaktion von CBF aus endothelialen EA.hy 926 Zellen hatten wir bereits vorher gezeigt [92], sie diente hier als Positivkontrolle (Abb. 9).

Abb. 9 EMSA - Interaktion von CBF aus EA.hy 926 und Kelly Zellen mit der CCAAT-Box bei -226 im ECE-1c Promotor



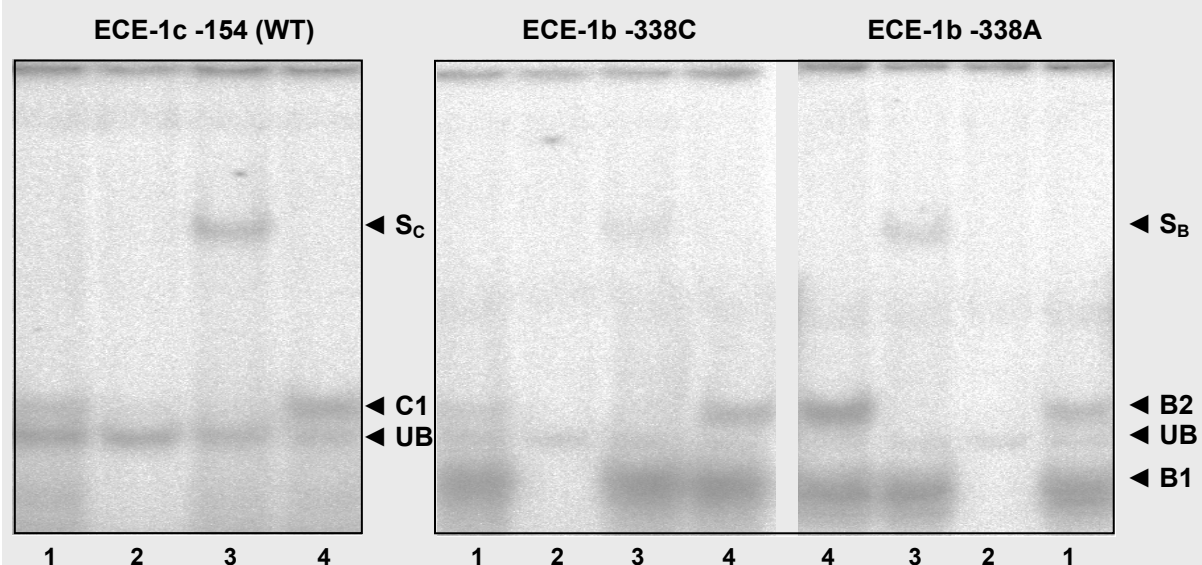
[5] Kernprotein aus EA.hy 926 und Kelly Zellen wurde mit radioaktiv markiertem ODN analog zu der CCAAT-Box inkubiert;
 [4] Zugabe von Kompetitor (nicht-radioaktiv markiertes ODN) kompetiert die spezifischen *Shifts* S1, S2 und S3
 [3] Zugabe von Anti-CBF-A Antikörper, nicht jedoch Zugabe von Anti-GATA-2 [2] oder Anti-GATA-3 Antikörper [1] bewirkt ein Verschwinden des spezifischen *Shifts* S3, nicht aber der spezifischen *Shifts* S1 und S2.

Nach Zugabe des Anti-CBF-A Antikörpers wurde *Shift* S3, nicht aber *Shift* S1 und S2 in Kelly und EA.hy 926 Zellen ausgelöscht. Dies zeigte sich auch im EMSA mit Proteinextrakten aus SK-N-MC (nicht gezeigt). Die *Shifts* S1 und S2 auslösenden Proteine konnten nicht identifiziert werden.

6.1.3 Unterschiede in der Affinität von E2F-2 zum ECE-1b und -1c Promotor

Mittels EMSA wurde die Affinität von E2F-2 aus einem Gliosarkom (Abb. 10) bzw. einem Meningeom Grad I (Abb. 11) mit den jeweiligen Bindungsstellen im ECE-1b bzw. ECE-1c Promotor verglichen. Mit beiden Proteinextrakten und für beide Promotorelemente wurde die Bindung von E2F-2 gezeigt. Die Affinität zum ECE-1b Promotor wurde in beiden Gewebeextrakten durch den SNP beeinflusst, wobei jeweils eine stärkere Affinität von E2F-2 zum Allel -338A als zum Allel -338C bestand. In Abb. 10 ist zu erkennen, dass E2F-2 aus dem Gliosarkomgewebe eine höhere Affinität zum untersuchten ECE-1c als zum ECE-1b Promotorabschnitt hat.

Abb. 10 EMSA – Interaktion von E2F-2 aus Gliosarkomgewebe (HW) mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b und ECE-1c Promotor



Eingesetzte ODN sind über der jeweiligen Darstellung angegeben.

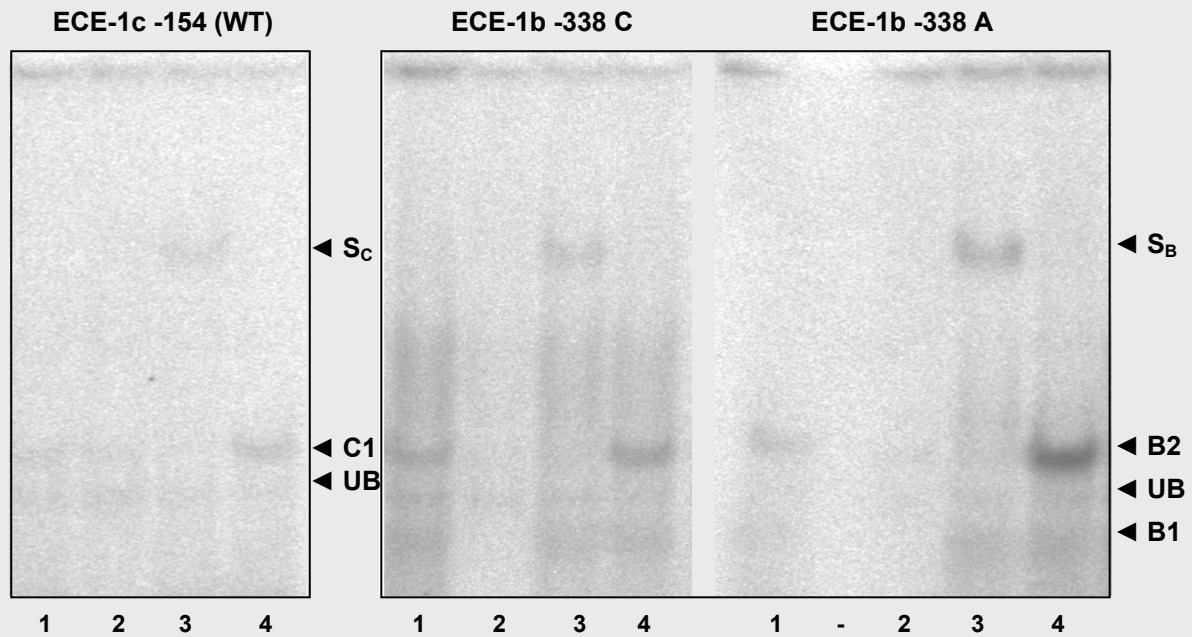
[1] nur Proteinextrakt und ODN

[2] Zugabe von Kompetitor (nicht-radioaktiv markiertes ODN), der die spezifischen *Shifts* C1 bzw. B1 und B2 kompetiert, nicht aber die unspezifische Bande (UB) verändert.

[3] Zugabe von Anti-E2F-2 Antikörper, nicht jedoch Zugabe eines Kontrollantikörpers in gleicher Menge (Anti-GATA-2 Antikörper) [4] überführen die spezifischen *Shifts* C1 bzw. B2 in *Supershifts* S_C bzw. S_B.

Dahingegen waren *Shift* und *Supershift* mit E2F-2 aus Meningeomextrakt (Abb. 11) stärker bei Verwendung des ODN ECE-1b -338A/C und wiesen damit eine höhere Affinität zur untersuchten E2F-Bindungsstelle im ECE-1b als im ECE-1c Promotor auf. Auch in Extrakten aus SK-N-MC war die Affinität von E2F-2 zum ECE-1b Promotor höher als die zum ECE-1c Promotor (nicht gezeigt).

Abb. 11 EMSA - Interaktion von E2F-2 aus Meningeomgewebe (DR) mit seinen Bindungsstellen im ECE-1b und -1c Promotor



Eingesetzte ODN sind über der jeweiligen Darstellung angegeben.

[1] nur Proteinextrakt und ODN

[2] Zugabe von Kompetitor (nicht-radioaktiv markiertes ODN), der die spezifischen Banden C1 bzw. B1 und B2 kompetiert, nicht aber die unspezifische Bande (UB) verändert.

[3] Zugabe von Anti-E2F-2 Antikörper, nicht jedoch Zugabe eines Kontrollantikörpers in gleicher Menge (Anti-GATA-2 Antikörper) [4] überführen den spezifischen *Shift* C1 bzw. B2 in einen *Supershift* S_C bzw. S_B.

6.2 Funktionalität der E2F-Bindungsstelle im ECE-1c Promotor

6.2.1 Promotorfunktionsanalyse mittels Reporteragen Assay

Wir konnten zeigen, dass durch die Mutation des E2F-Bindungsmotivs die Promotoraktivität des untersuchten ECE-1c Promotorabschnitts in endothelialen HMEC-1 Zellen auf 16 % der Wildtyp-Aktivität reduziert wird (Abb. 12).

Abb. 12 Reporteragen Assay – Bedeutung der E2F Bindungsstelle für Aktivität des ECE-1c Promotors in HMEC-1 Zellen

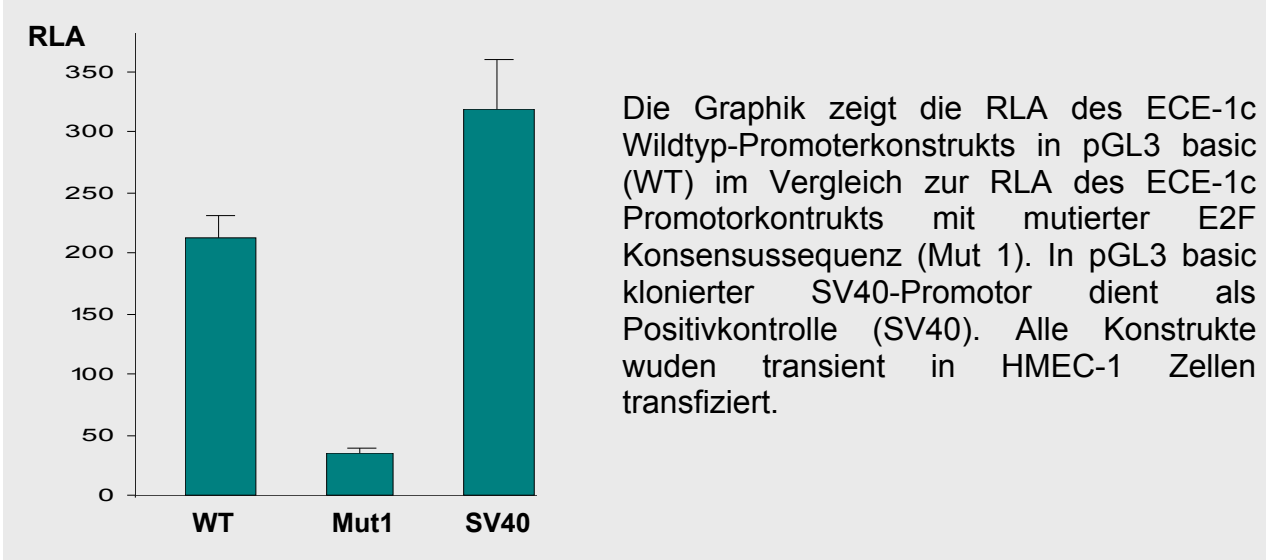
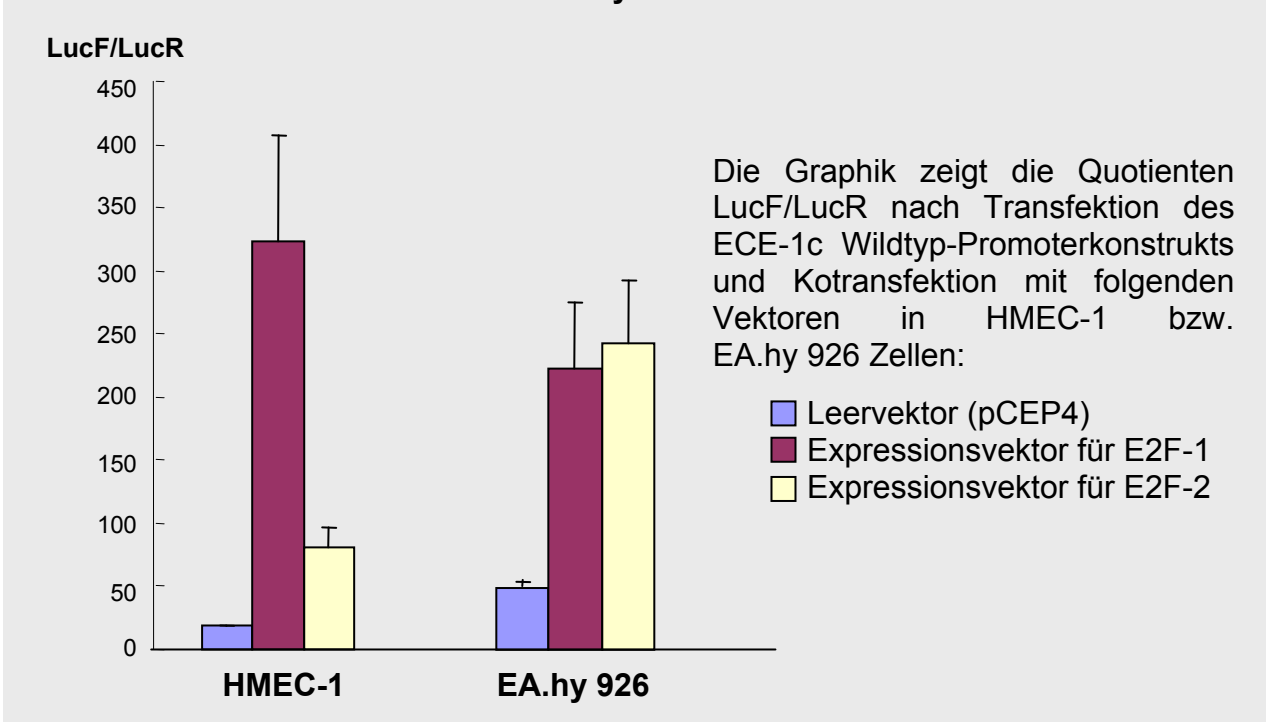


Abb. 13 Reporteragen Assay – Effekt der E2F-Überexpression auf die Aktivität des ECE-1c Promotors in HMEC-1 und EA.hy 926 Endothelzellen



Kotransfektion von E2F-1 und E2F-2 Expressionsvektoren erhöhte die Promotoraktivität des ECE-1c Promotors in HMEC-1 und EA.hy 926 Zellen (Abb. 13). Dabei wurde die Promotoraktivität in HMEC-1 Zellen durch E2F-1 stärker induziert als durch E2F-2, während in EA.hy 926 Zellen beide Transkriptionsfaktoren die Promotoraktivität etwa gleich stark induzierten.

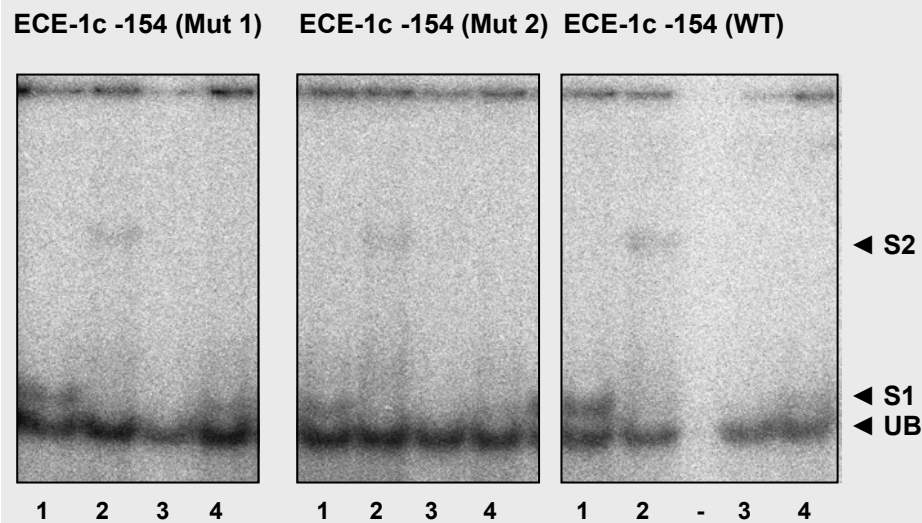
6.2.2 Datenbankanalyse zur Bestimmung von Bindungsmotiven

Die Programme MatInspector (Genomatix Software GmbH, München, Deutschland, <http://www.genomatix.de>; [132]) und Transfac (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, Deutschland, <http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfact>, [133]) erlauben eine Analyse der Ähnlichkeit einer DNA-Sequenz zu bekannten und in Datenbanken gespeicherten Transkriptionsfaktor-Konsensussequenzen bzw. -Bindungsmotiven. Während die Wildtyp-Promotorsequenz hohe Ähnlichkeitswerte mit bekannten E2F Konsensussequenzen aufwies, ergaben beide Analysen, dass die im Reporteragen Assay analysierte Mutation analog der Sequenz des ODN ECE-1c -154 (Mut1): 5'-CGGCACTCGGTTCCGAAGCCGCGAG-3' sowie eine weitere Mutation analog der Sequenz des ODN ECE-1c -154 (Mut2): 5'-CGGCACTCGGTACCGAAGCCGCGAG-3' in diesem Promotorabschnitt keine Ähnlichkeit mehr mit bekannten E2F Konsensussequenzen hat.

6.2.3 Auswirkungen der Mutation auf die E2F-2 Bindungsaffinität im EMSA

Um die Auswirkungen der Mutation des E2F Bindungsmotivs im ECE-1c Promotor auf die Affinität zu E2F-2 zu überprüfen, führten wir einen EMSA mit Proteinextrakten aus EA.hy 926 (Abb. 14) sowie HMEC-1 Zellen (nicht abgebildet) durch. Dabei wurde die Bindungsaffinität von E2F-2 zu den die Mutation tragenden ODN ECE-1c -154 (Mut1): 5'-CGGCACTCGGTTCCGAAGCCGCGAG-3' und ECE-1c -154 (Mut2): 5'-CGGCACTCGGTACCGAAGCCGCGAG-3' mit der Wildtyp-Sequenz ECE-1c -154 (WT): 5'-CGGCACTCGGCGCCGAAGCCGCGAG-3' verglichen. Die Intensität des *Shifts* sowie des *Supershift* stellte sich in allen Fällen gleich stark dar. Daraus lässt sich ableiten, dass die Bindungsaffinität von E2F-2 durch die Mutation nicht wesentlich verändert wurde.

Abb. 14 EMSA- Vergleich der Bindungsaffinität von E2F-2 aus EA.hy 926 Zellen zum Wildtyp bzw. mutiertem E2F Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor



Eingesetzte ODN sind über der jeweiligen Darstellung angegeben.

[4] nur Proteinextrakt und ODN

[3] Zugabe von Kompetitor (nicht-radioaktiv markiertes ODN) verändert den spezifischen *Shift* S1, nicht aber die unspezifische Bande (UB).

[2] Zugabe von Anti-E2F-2 Antikörper, nicht aber Zugabe von Kontrollantikörper in gleicher Menge (Anti-GATA-2 Antikörper) [1] überführen den spezifischen *Shift* S1 in einen *Supershift* S2.

6.3 Proteinexpression von Transkriptionsfaktoren

6.3.1 Expression von E2F in Hirntumoren und Zelllinien

6.3.1.1 Expression von E2F in Hirntumoren

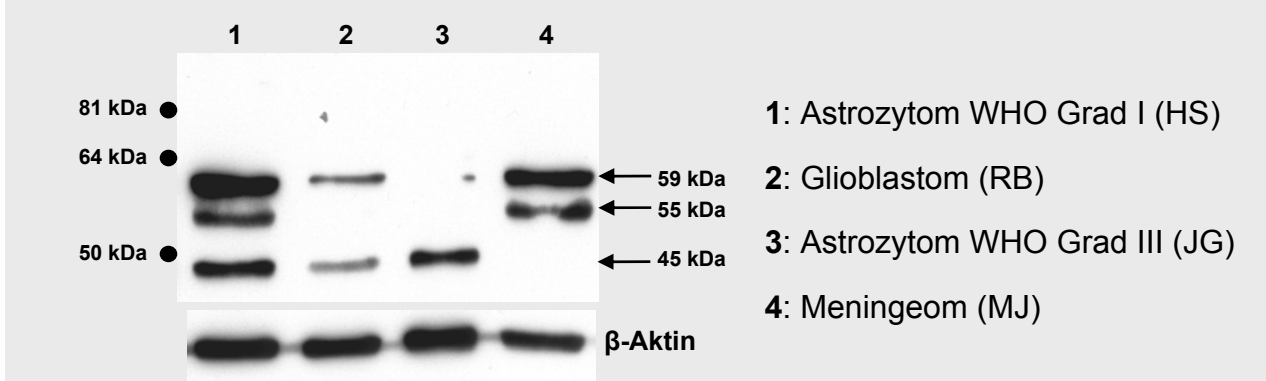
Nachdem die funktionelle Bedeutung des E2F-Bindungsmotivs im ECE-1c Promotor in endothelialen Zellen und die Bindung von E2F-2 an dieses Promotorelement in allen untersuchten Proteinextrakten gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach eventuellen Unterschieden in der Proteinexpression der E2F Familienmitglieder, insbesondere von E2F-2 in den neuroepithelialen und meningealen Tumoren. Diese wurde mittels Western Blot untersucht.

E2F-1 Expression in Hirntumoren

Einen repräsentativen Western Blot zum Nachweis von E2F-1 in vier Hirntumoren zeigt Abb. 15. Die ungefähren Molekulargewichte der in den untersuchten Geweben vom E2F-1 Antikörper detektierten Proteine sind Tab. 6 zu entnehmen. Mindestens eine Bande wurde in allen untersuchten intrakraniellen Tumoren: 8 Astrozytome (1 x WHO

Grad I, 1 x WHO Grad II-III, 1 x WHO Grad III und 5 Glioblastome WHO Grad IV), 1 Oligoastrozytom WHO II-III, 2 Oligodendrogliome und 3 Meningeomen sowie in nicht-neoplastisch veränderter Großhirnrinde detektiert.

Abb. 15 Western Blot- Analyse der E2F-1 Expression in Hirntumoren



In vier repräsentativen Hirntumoren lassen sich verschiedene E2F-1 Varianten nachweisen. β-Aktin dient als Kontrolle für gleichmäßige Beladung. Links ist mit Punkten das Molekulargewicht (MW) des mitgeführten Standards, rechts das MW detektierter Banden durch Pfeile dargestellt. Buchstaben hinter den Tumorentitäten entsprechen den kodierte Patienteninitialen.

Tab. 6 Expression von E2F-1 Proteinvarianten in Hirntumoren

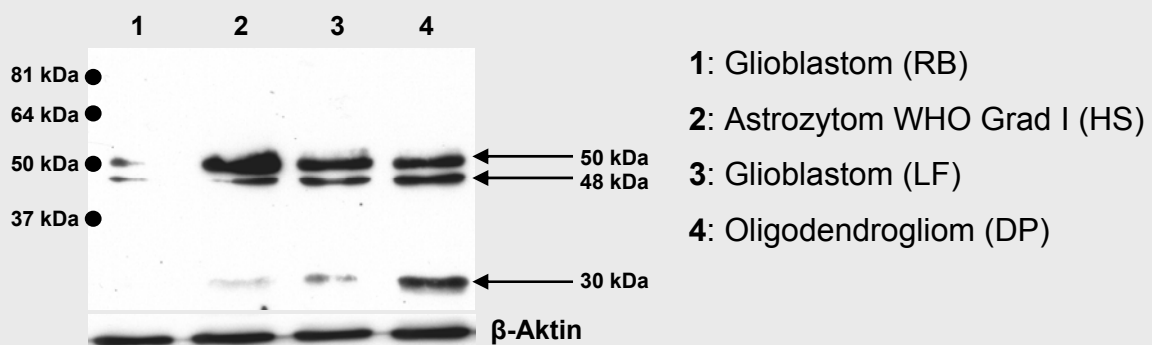
	PA	AA (III)	A (II-III)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GS	OA (II-III)	OD	OD (II-III)	M III	M	M	Ko
	HS	JG	DS	RB	LF	HK	PB	HW	RW	DP	PJ	HH	MJ	RD	
kDa															
62										(X)	X	X			
59	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
55	X		X		X		X	X		X	X	X	X		X
45	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X

Für jedes Gewebe ist in der zugehörigen Spalte die Nachweisbarkeit der einzelnen Banden durch ein X in der entsprechenden Zeile markiert. Die Zeilen sind jeweils einem Molekulargewicht in kDa zugeordnet, das anhand eines mitgeführten Standards abgeschätzt wurde. Freie Felder bedeuten fehlende, (X) schwache oder inkonstante Banden. A=Astrozytom; PA=Pilozytisches A, AA=Anaplastisches A; GBM=Glioblastoma multiforme; GS=Glisarkom (Unterform des GBM); OA=Oligoastrozytom; OD=Oligodendrogliom; M=Meningeom; Ko=nicht-neoplastisch veränderte Großhirnrinde (Kontrolle); darunter WHO Grad in römischen Ziffern; kodierte Patienteninitialen stehen in Zeile 2.

E2F-2 Expression in Hirntumorgeweben

E2F-2 ließ sich in allen untersuchten intrakraniellen Tumoren, außer in einem Oligoastrozytom WHO Grad II-III nachweisen. Nicht detektierbar war E2F-2 in der nicht-neoplastisch veränderten Großhirnrinde. Abb. 16 zeigt einen repräsentativen Western Blot mit der Detektion von E2F-2 in vier untersuchten Tumorproben. Detektierte Banden in allen untersuchten Geweben sind Tab. 7 zu entnehmen.

Abb. 16 Western Blot- Analyse der E2F-2 Expression in Hirntumoren



In vier repräsentativen Hirntumoren lassen sich verschiedene E2F-2 Varianten nachweisen. β-Aktin dient als Kontrolle für gleichmäßige Beladung. Links ist mit Punkten das Molekulargewicht (MW) des mitgeführten Standards, rechts das MW detektierte Banden durch Pfeile dargestellt. Buchstaben hinter den Tumorentitäten entsprechen den kodierte Patienteninitialen.

Tab. 7 Expression von E2F-2 Proteinvarianten in Hirntumoren

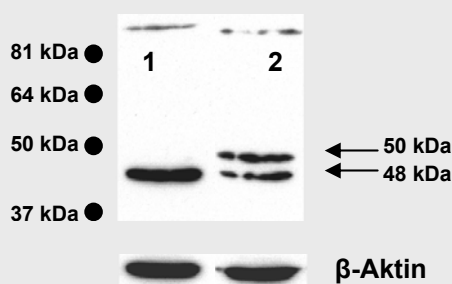
	PA	AA (III)	A (II-III)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GS	OA (II-III)	OD	OD (II-III)	M III	M	M	Ko
	HS	JG	DS	RB	LF	HK	PB	HW	RW	DP	PJ	HH	MJ	RD	
kDa															
50	X		X	(X)	X		X	X		X	X	X	X		
48	X	X		(X)	X	X	X	X		X	X	X		X	
30	(X)	X			(X)					X	X	X	X		

Für jedes Gewebe ist in der zugehörigen Spalte die Nachweisbarkeit der einzelnen Banden durch ein X in der entsprechenden Zeile markiert. Die Zeilen sind jeweils einem Molekulargewicht in kDa zugeordnet, das anhand eines mitgeführten Standards abgeschätzt wurde. Freie Felder bedeuten fehlende, (X) schwache oder inkonstante Banden. A=Astrozytom; PA=Pilozytisches A, AA=Anaplastisches A; GBM=Glioblastoma multiforme; GS=Gliosarkom (Unterform des GBM); OA=Oligoastrozytom; OD=Oligodendrogliom; M=Meningeom; Ko=nicht-neoplastisch veränderte Großhirnrinde (Kontrolle); darunter WHO Grad in römischen Ziffern; kodierte Patienteninitialen stehen in Zeile 2.

Vergleich der E2F-2 Varianten in Hirntumoren mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zu den ECE-1 Promotoren

Im Abschnitt 6.1.3 wurde dargestellt, dass sich E2F-2 aus einem Gliosarkom- und einem Meningeomgewebe in der Bindungsaffinität zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c im Vergleich zum ECE-1b Promotor unterscheidet. Die Analyse der E2F-2 Expression in diesen Tumoren im Western Blot zeigte, dass in dem Gliosarkom zwei Banden vom Anti-E2F-2 Antikörper detektiert wurden (Molekulargewichte von 48 und 50 kDa), während im Meningeom nur die kleinere Variante (48 kDa) nachweisbar war (Abb. 17).

Abb. 17 Vergleich der E2F-2 Expression in Meningeom- und Gliosarkomgewebe



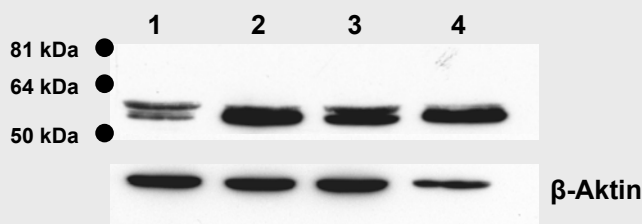
1: Meningeom (DR)
2: Gliosarkom (HW)

β-Aktin dient als Kontrolle für gleichmäßige Beladung. Links ist mit Punkten das Molekulargewicht (MW) des mitgeführten Standards, rechts das MW der im Text genannten Banden durch Pfeile dargestellt. Zwei Buchstaben hinter den Tumorentitäten stehen für die kodierte Patienteninitialen.

E2F-3 Expression in Hirntumoren

E2F-3 wurde im Western Blot untersucht. Die stärkste Bande war bei 55 kDa nachweisbar, teilweise in Form einer Doppelbande (Abb. 18).

Abb. 18 Western Blot- Analyse der E2F-3 Expression in Hirntumoren



1: Meningeom (RD)
2: Glioblastom (PB)
3: Gliosarkom (HW)
4: Meningeom (MJ)

In vier repräsentativen Hirntumoren lässt sich E2F-3 nachweisen

β-Aktin dient als Kontrolle für gleichmäßige Beladung. Links ist mit Punkten das Molekulargewicht (MW) des mitgeführten Standards, rechts das MW detektierter Banden durch Pfeile dargestellt. Zwei Buchstaben hinter den Tumorentitäten stehen für die kodierte Patienteninitialen.

Die Expression von E2F-3 in allen untersuchten Hirntumoren ist Tab. 8 zu entnehmen. E2F-3 ist in 3/3 Meningeomen, 2/2 Oligodendrogliomen, 1/1 Astrozytom WHO Grad I, 1/1 Astrozytom WHO II-III und 3/5 Glioblastomen sowie in einer nicht-neoplastisch

veränderten Großhirnrinde detektierbar. Es war in 1/1 Astrozytom WHO III und 1/1 Oligoastrozytom nicht nachweisbar.

Tab. 8 Expression von E2F-3 in Hirntumoren

	PA	AA (III)	A (II-III)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GS	OA (II-III)	OD	OD (II-III)	M III	M	M	Ko
	HS	JG	DS	RB	LF	HK	PB	HW	RW	DP	PJ	HH	MJ	RD	
kDa															
60											(X)	(X)			
55	X		X		X		DB	DB		X	X	X	X	DB	X
52											(X)	(X)			

Für jedes Gewebe ist in der zugehörigen Spalte die Nachweisbarkeit der einzelnen Banden durch ein X in der entsprechenden Zeile markiert. Die Zeilen sind jeweils einem Molekulargewicht zugeordnet, das anhand eines mitgeführten Standards abgeschätzt wurde. Freie Felder bedeuten fehlende, (X) schwache oder inkonstante Banden. A=Astrozytom; PA=Pilozytisches A, AA=Anaplastisches A; GBM=Glioblastoma multiforme; GS=Gliosarkom (Unterform des GBM); OA=Oligoastrozytom; OD=Oligodendrogliom; M=Meningeom; Ko=nicht-neoplastisch veränderte Großhirnrinde (Kontrolle); darunter WHO Grad in römischen Ziffern; kodierte Patienteninitialen stehen in Zeile 2.

6.3.1.2 Expression von E2F in Zelllinien

Die Expressionsanalyse der aktivierenden E2F-Familienmitglieder in Zelllinien erfolgte in fraktionierten (nukleären und zytosolischen) Proteinextrakten im Western Blot sowie in der Immunzytologie.

Expression und subzelluläre Lokalisation von E2F-1 in Zelllinien

Im Western Blot ließ sich in den endothelialen Zelllinien EA.hy 926 (nicht gezeigt) und HMEC-1 (Abb. 8) E2F-1 in Form eines 64 kDa großen Proteins in der nukleären Proteinfraction nachweisen. In U373 MG Gliomzellen zeigten sich drei Banden bei 64, 48 und 30 kDa, von denen das Signal bei 64 kDa am stärksten und vor allem in der nukleären Fraktion nachweisbar war (Abb. 7). In neuroblastären Kelly Zellen war E2F-1 (64 kDa) nur in der nukleären Fraktion nachweisbar (nicht gezeigt). Mittels Immunzytologie ließ sich in EA.hy926 Endothelzellen sowie in U373 MG Gliomzellen die nukleäre Lokalisation von E2F-1 nachweisen (Abb. 19). Auch in neuroblastären SK-N-MC- Zellen gelang immunzytologisch der ausschließlich nukleäre Nachweis von E2F-1 (nicht gezeigt).

Expression und subzelluläre Lokalisation von E2F-2 in Zelllinien

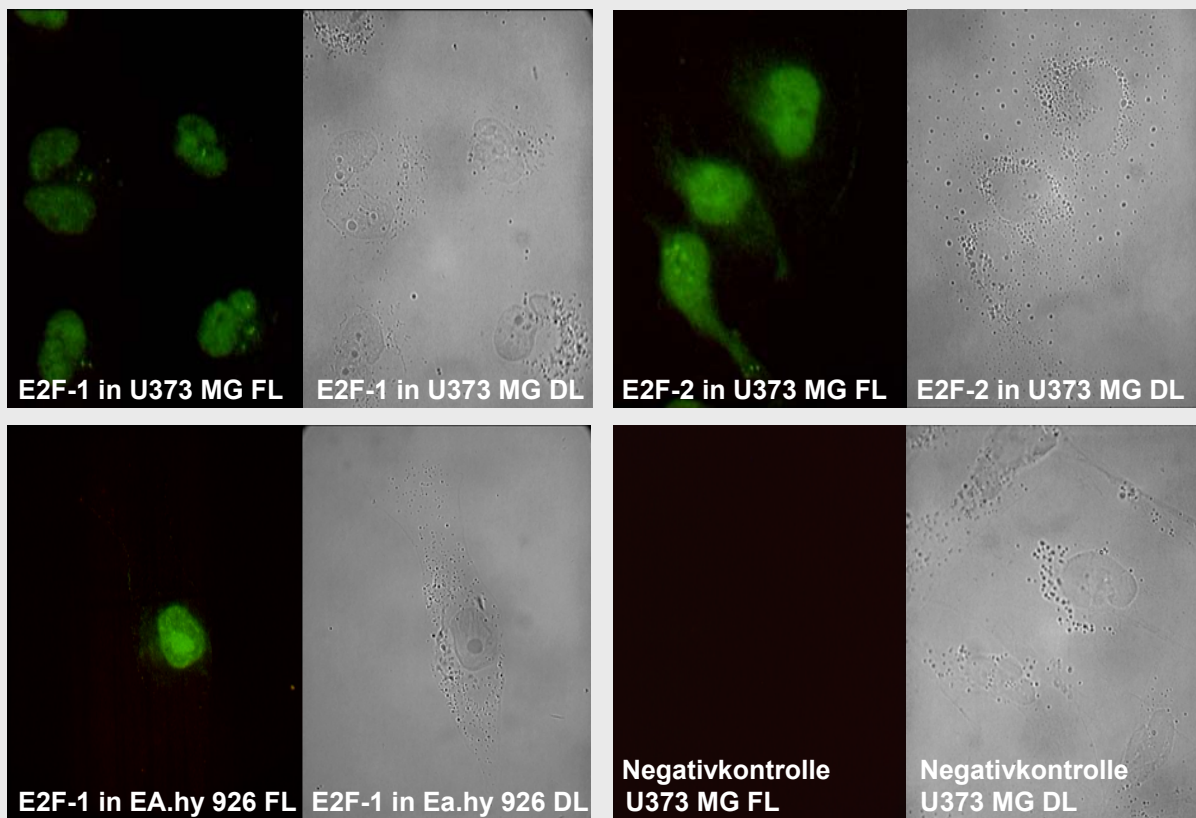
Alle im Western Blot mit dem Anti-E2F-2 Antikörper detektierten Proteine sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9 Expression von E2F-2 in Zelllinien

Fraktion	EA.hy 926		HMEC-1		U373 MG		SK-N-MC		Kelly	
	N	Z	N	Z	N	Z	N	Z	N	Z
64 kDa			(X)		X		X		X	
50 kDa	Xa	Xa	(X)	Xa	Xa	Xa		Xb		Xb
48 kDa	Xb	Xb		Xa	Xb	Xb		Xa	X	Xa

Für jede Zelllinie ist für die nukleäre (N) und zytosolische (Z) Fraktion in der zugehörigen Spalte die Nachweisbarkeit der einzelnen Banden durch X in der entsprechenden Zeile markiert. Die Zeilen sind jeweils einem Molekulargewicht (MW) zugeordnet. (X) bedeutet schwache oder inkonstante Bande. Die stärkere der beiden Banden bei 48 und 50 kDa ist durch X mit Index a gekennzeichnet, die schwächere mit b, sind beide gleich stark, tragen beide ein a.

Abb. 19 Immunzytologie - E2F-1 und E2F-2 in Endothel- und Gliomzellen



Die nukleäre Lokalisation von E2F-1 kann in der endothelialen Zelllinie EA.hy 926 (links unten) sowie in der glialen Zelllinie U373 MG (links oben) gezeigt werden. E2F-2 ist in U373 MG (rechts oben) hauptsächlich im Kern detektierbar, ein schwächeres zytoplasmatisches Signal ist aber erkennbar. In der Negativkontrolle (Sekundärantikörper alleine) sieht man in U373 MG (rechts unten) sowie EA.hy 926 (nicht dargestellt) kein Signal. Neben jeder fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (FL) ist das entsprechende Bild der Durchlichtmikroskopie (DL) gezeigt.

Der Anti-E2F-2 Antikörper detektierte wie zuvor in den Tumoren Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 48 und 50 kDa. Die beiden Varianten von 48 kDa und 50 kDa waren in allen untersuchten Zelllinien (EA.hy 926, HMEC-1, U373 MG, SK-N-MC und Kelly) immer in der zytosolischen Proteinfraction, teilweise auch in der nukleären Fraktion nachweisbar. Der Anti-E2F-2 Antikörper detektierte zudem in U373 MG-, Kelly- und SK-N-MC- Zellen in der nukleären Fraktion ein Signal bei 64 kDa. Mit Extrakten aus EA.hy 926 konnte durch den Einsatz von *Blocking Peptide* die Spezifität der Bindung zwischen dem E2F-2 Antikörper und dem Signal bei 48 und 50 kDa gezeigt werden (nicht dargestellt).

Mittels Immunzytologie wurde die Expression von E2F-2 der glialen Zelllinie U373 MG (Abb.19) sowie in der endothelialen Zelllinie EA.hy 926 (nicht dargestellt) nachgewiesen. Es zeigte sich ein deutliches nukleäres Signal für E2F-2, allerdings wurde in beiden Zelllinien zusätzlich in geringerer Intensität ein zytoplasmatisches Protein vom E2F-2 Antikörper detektiert.

Expression und subzelluläre Lokalisation von E2F-3 in Zelllinien

Die Western Blot Analyse der E2F-3 Expression ergab in den neuroblastären Zelllinien SK-N-MC und Kelly den Nachweis von E2F-3 in Form einer Doppel- bzw. in SK-N-MC in Form einer Einfachbande zwischen 50 und 55 kDa in 20 µg nukleärem Proteinextrakt. Diese Bande war in der gleichen Menge zytosolischen Proteins nicht nachweisbar. In U373 MG Glioblastom- sowie EA.hy 926 Endothelzellen war hingegen nur eine schwache Doppelbande in 20 µg Protein detektierbar, bei Einsatz von 47 µg nukleärem Protein aus U373 MG konnte ein stärkeres Signal detektiert werden (Abb. 7). Eine weitere Bande bei 60 kDa zeigte sich in der nukleären und zytosolischen Fraktion von EA.hy 926, SK-N-MC und Kelly. In der zytosolischen Proteinfraction von EA.hy 926 sowie von U373 MG, nicht aber von Kelly und SK-N-MC ließ sich bei ca. 57 kDa mit dem E2F-3 Antikörper ein Protein detektieren.

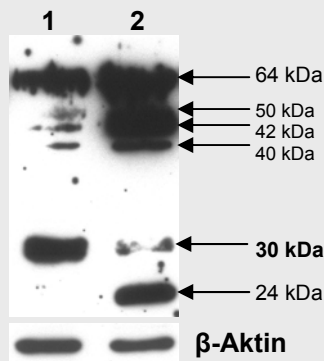
6.3.2 Expression von GATA-2 und GATA-3 in Hirntumoren und Zelllinien

Die GATA-Familienmitglieder GATA-2 und GATA-3 konnten bei positiver Positivkontrolle (Protein aus Rattenvollblut) auf Proteinebene in 20 µg der untersuchten intrakraniellen Tumoren sowie in zytosolischen und nukleären Proteinfractionen der Zelllinien U373 MG, Kelly, SK-N-MC und EA.hy 926 nicht detektiert werden (nicht gezeigt).

6.3.3 Expression von CBF-A in Hirntumoren und Zelllinien

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass CBF aus den neuroblastären Zelllinien SK-N-MC und Kelly an die CCAAT-Box im ECE-1c Promotor bindet. Die Expression der Untereinheit CBF-A wurde nun im Western Blot untersucht. Abb. 20 zeigt beispielhaft die CBF-A Expression in zwei der untersuchten Tumorgewebe.

Abb. 20 Western Blot - CBF-A Expression in Hirntumoren



1: Meningeom (DR)

2: Astrozytom WHO Grad IV (PB)

In zwei repräsentativen Hirntumoren lässt sich CBF-A nachweisen. β -Aktin dient als Kontrolle für gleichmäßige Beladung. Rechts ist mit Pfeilen das Molekulargewicht detektierter Banden dargestellt. Zwei Buchstaben hinter den Tumorentitäten stehen für die kodierte Patienteninitialen.

Die mit dem Anti-CBF-A Antikörper in den untersuchten Tumorgeweben detektierten Proteine sind Tab. 10 zu entnehmen. CBF-A (30 kDa) wurde in allen untersuchten Tumoren detektiert.

In jeweils 20 μ g der nukleären Proteinfraction aus SK-N-MC, Kelly und EA.hy 926 Zellen war CBF-A (30-32 kDa) nachweisbar. In der zytosolischen Fraction war in diesem Molekulargewichtsbereich keine (EA.hy 926) bzw. eine schwache Bande (SK-N-MC und Kelly) nachweisbar (nicht dargestellt). Immunzytologisch wurde CBF-A in Zellen der Linie U373 MG ausschließlich in nukleärer Lokalisation nachgewiesen (nicht dargestellt).

Tab. 10 Expression von CBF-A in Hirntumoren

	PA	AA (III)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM	GS	OD	OD (II-III)	M III	M	M
	HS	JG	RB	LF	HK	PB	HW	DP	PJ	HH	MJ	RD
kDa												
64					X	X	X				(X)	X
50	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
42						X	X				X	X
40	X		X			X					X	X
30	(X)	X	(X)	(X)	X	(X)	X	X	X	X	X	X
26	(X)			(X)				(X)	X	X	X	
24	X					X	X		X	X	X	

Für jedes Gewebe ist in der zugehörigen Spalte die Nachweisbarkeit der einzelnen Banden durch ein X in der entsprechenden Zeile markiert. Die Zeilen sind jeweils einem Molekulargewicht (MW) zugeordnet, das anhand eines mitgeführten Standards abgeschätzt wurde. Freie Felder bedeuten fehlende, (X) schwache oder inkonstante Banden. A=Astrozytom; PA=Pilozytisches A, AA=Anaplastisches A; GBM=Glioblastoma multiforme; GS=Gliosarkom (Unterform des GBM); OA=Oligoastrozytom; OD=Oligodendrogliom; M=Meningeom; darunter WHO Grad in römischen Ziffern; kodierte Patienteninitialen stehen in Zeile 2.

6.4 Proteinexpression von ECE-1 in Hirntumoren und Zelllinien

6.4.1 Expression von ECE-1 in Hirntumoren

Die Expression von ECE-1 Protein (alle Isoformen) wurde mittels Western Blot analysiert. Eingesetzt wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Aus der Literatur ist für ECE-1 in primären Rattenastrozyten ein Molekulargewicht von 110 bis 120 kDa beschrieben [134] bzw. für humanes rekombinantes ECE-1 eines zwischen 97 und 116 kDa [87]. Bei der Auswertung der Western Blots wurden diese aus der Literatur bekannten Molekulargewichte von ECE-1 berücksichtigt. Die relative ECE-1 Expression der Tumoren (ECE-1 rel) ist Tab. 11 zu entnehmen. Sie unterschied sich deutlich in den untersuchten Hirntumoren. Abb. 21 zeigt beispielhaft die Expression von ECE-1 in vier Hirntumoren.

6.4.2 Vergleich der Expression von ECE-1 mit der von E2F-2 Varianten

Da die Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c sowie im ECE-1b Promotor nachgewiesen werden konnte, wurde nun untersucht, ob eine Korrelation der Proteinexpression von E2F-2 mit der von ECE-1 besteht. In Tab. 11 sind für die

untersuchten Tumoren die Expression der E2F-2 Varianten bei 48 und 50 kDa sowie die relative ECE-1 Expression eingetragen.

Tab. 11 Western Blot - ECE-1 und E2F-2 Expression in Hirntumoren

	PA	AA (III)	GBM (IV)	GBM (IV)	GBM (IV)	GS	OD (II-III)	M III	M	M	Met
	HS	JG	LF	HK	PB	HW	PJ	HH	MJ	RD	ES
ECE-1 rel	1,37	0,20	1,01	< 0,1	0,71	1,03	0,46	0,42	1,00	< 0,1	1,64
E2F-2 p50	X		X		X	X	X	X	X		X
E2F-2 p48	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X

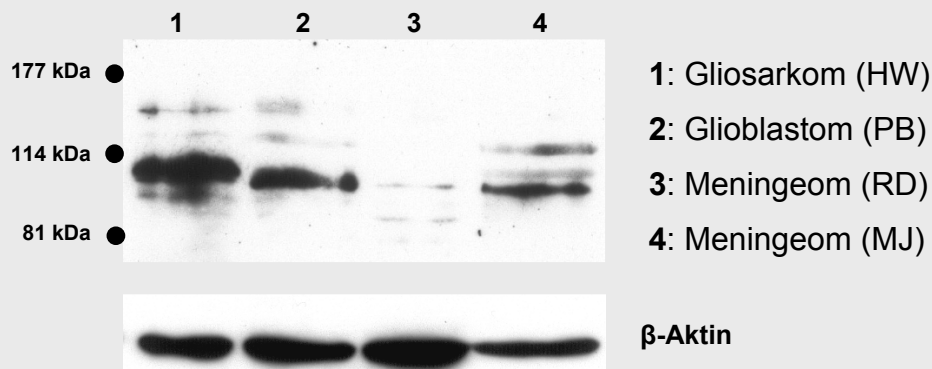
Aus der Tabelle ist für die einzelnen untersuchten Hirntumoren die relative ECE-1 (ECE-1 rel) Expression dargestellt. In den unteren beiden Zeilen ist die im Western Blot bestimmte Expression der E2F-2 Banden bei 50 kDa (E2F-2 p50) und bei 48 kDa (E2F-2 p48) durch X gekennzeichnet. PA = Pilozytisches Astrozytom; AA = Anaplastisches Astrozytom; GBM = Glioblastoma multiforme; GS = Gliosarkom OD = Oligodendrogliom; M = Meningeom; Met = Metastase, kodierte Patienteninitialen stehen in Zeile 2

$$\text{ECE-1 rel (Tumor)} = \frac{\text{ECE-1 (Tumor)} / \beta\text{-Aktin (Tumor)}}{\text{ECE-1 (Referenz tumor)} / \beta\text{-Aktin (Referenz tumor)}}$$

Die ECE-1 Signalstärke wurde jeweils auf die Intensität des β-Aktin Signals bezogen. Um die Ergebnisse unterschiedlicher Western Blots miteinander zu vergleichen, diente eine bestimmte Tumorproteinprobe als „Referenz“. Die Intensität des ECE-1 Signals im Verhältnis zum β-Aktin-Signal wurde für diesen Tumor in jedem Blot gleich eins gesetzt. Die auf β-Aktin standardisierte ECE-1 Expression der anderen Tumoren wurde relativ zu diesem Referenz tumor angegeben.

Es fällt auf, dass die drei Tumoren mit der geringsten ECE-1 Expression die E2F-2 Variante von 50 kDa nicht exprimieren. Da keine isoformspezifischen Antikörper für ECE-1 verfügbar waren, konnte eine Untersuchung der einzelnen ECE-1 Isoformen auf Proteinebene leider nicht durchgeführt werden, so dass lediglich die ECE-1 Gesamtexpression zur Analyse herangezogen werden konnte.

Abb. 21 Western Blot Analyse der ECE-1 Expression in vier Hirntumoren

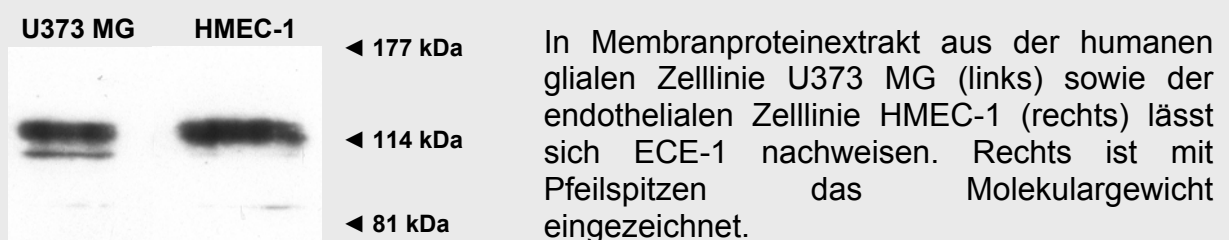


β-Aktin dient als Beladungskontrolle. Links ist mit Punkten das Molekulargewicht eingezeichnet. Buchstaben hinter den Tumorentitäten entsprechen den kodierten Patienteninitialen.

6.4.3 Expression von ECE-1 in Zelllinien

In den Zelllinien U373 MG (glial) und HMEC-1 (endothelial) konnte im EMSA die Bindung von E2F-2 an das E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotoren gezeigt werden. Weiterhin zeigte sich die Bindung des entsprechenden ODN an ein 50 kDa großes Protein in den beiden Zelllinien im Southwestern Blot. Mittels Western Blot wurde nun ECE-1 in Membranproteinextrakten aus den beiden Zelllinien analysiert (Abb. 22). In beiden Zelllinien konnte ECE-1 nachgewiesen werden.

Abb. 22 Western Blot - ECE-1 Expression in U373 MG und HMEC-1



7 DISKUSSION

7.1 Spezifische Interaktion von E2F-2 mit ECE-1 Promotoren

7.1.1 Spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor

Mittels EMSA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass E2F-2, nicht aber E2F-1 oder E2F-3 aus Proteinextrakten astrozytärer und meningealer Tumorgewebe sowie neuroblastärer Zellen hochspezifisch mit seinem Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor interagiert. Obwohl in den hier untersuchten Tumoren im Western Blot nicht nur die Expression von E2F-2, sondern auch die von E2F-1 und E2F-3 nachgewiesen wurde, überführte nur der gegen E2F-2 gerichtete Antikörper den spezifischen *Shift* S1 vollständig in einen *Supershift* (Abb. 5). Dies deutet auf die spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv hin. Der ECE-1b Promotor stellt damit eine mögliche Zielstruktur von E2F-2 in humanen Tumoren des Nervensystems dar. Dieses Ergebnis stimmt überein mit früheren Beobachtungen in endothelialen EA.hy 926 Zellen, in denen ebenfalls eine spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor gezeigt wurde [94]. Die EMSA-Experimente ergaben noch einen weiteren spezifischen *Shift* S2, der in den neuroblastären SK-N-MC Zellen einen höhermolekularen Protein-DNA-Komplex darstellt und dessen molekulare Ursache unklar bleibt. Es könnte sich dabei die DNA-Interaktion eines weiteren hier nicht untersuchten E2F-Familienmitglieds oder um eine Interaktion mit einem Komplex aus E2F und einem *pocket* Protein handeln. Ferner befindet sich an dieser Stelle ein GATA-Bindungsmotiv [94], wäre daher eine Bindung von GATA an diesen ECE-1b Promotorabschnitt denkbar. Die Expression von GATA-2 und GATA-3 konnte auf Proteinebene jedoch nicht nachgewiesen werden und die Anti-GATA-2 und Anti-GATA-3 Antikörper veränderten den *Shift* S2 ebenfalls nicht. Zur GATA-Familie gehören zwar noch weitere hier nicht untersuchte Faktoren, die mögliche Interaktionspartner für das untersuchte Promotorelement darstellen, aber nur für GATA-2 und GATA-3 ist die Expression in neuronalen Geweben bekannt [116-118].

Das E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor unterliegt einem genetischen Polymorphismus. Der Vergleich der im EMSA untersuchten Bindungsaffinitäten von E2F-2 ergab in allen analysierten Zellen und Geweben einen stärkeren *Shift* und *Supershift* mit dem ODN korrespondierend zu Allel -338A, was auf eine stärkere Bindung von E2F-2 zu diesem Allel hindeutet. Die funktionelle Relevanz des Polymorphismus konnte bereits früher im Reportergen Assay in endothelialen EA.hy 926-Zellen gezeigt werden, in denen das Allel -338A mit einer erhöhten Promotoraktivität assoziiert war [94]. Die klinische Relevanz dieses Polymorphismus zeigt sich in der Assoziation des Vorliegens von Allel -338A mit erhöhten Blutdruckwerten bei hypertensiven Frauen [93, 94]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die erhöhte ECE-1b-Promotoraktivität bei vorliegendem Allel -338A mit erhöhter ECE-1b mRNA Expression assoziiert ist und dass Homozygotie für das Allel -338A mit einem signifikant reduzierten Risiko, an einem Morbus Alzheimer zu erkranken, verbunden ist [135]. Eine mögliche Erklärung für das reduzierte Alzheimerisiko stellt die beobachtete Bedeutung von ECE-1 für die Spaltung von β -Amyloid dar [79]. Die funktionelle Relevanz des Polymorphismus in der Pathogenese neuroepithelialer oder meningealer Tumoren ist hingegen bisher nicht gezeigt worden. Es wäre interessant zu vergleichen, ob auch in neuroepithelialen und meningealen Zellen die Promotoraktivität bei Vorliegen des Allels -338A höher ist. Weiterhin sollte man untersuchen, ob das Tumorrisiko, die Progression bzw. der Malignitätsgrad der Tumoren bei dem Vorliegen eines der beiden Allele signifikant verändert ist.

7.1.2 Spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor

Mittels EMSA konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass E2F-2 aus Proteinextrakten, die aus astrozytärem und meningealem Tumorgewebe sowie glialen, neuroblastären und endothelialen Zellen gewonnen wurden, spezifisch mit dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor interagiert. Obwohl im Western Blot in den untersuchten Tumoren nicht nur E2F-2, sondern auch E2F-1 und E2F-3 nachweisbar waren, überführt nur der gegen E2F-2 gerichtete Antikörper den spezifischen *Shift* in einen *Supershift* (Abb. 6). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit stellt der ECE-1c Promotor eine mögliche Zielstruktur von E2F-2 dar. Eine spezifische Interaktion von E2F-2 mit dem ECE-1c Promotor konnte bereits in der endothelialen Zelllinie EA.hy 926 gezeigt werden [92]. E2F-2 aus allen untersuchten Tumoren und Zelllinien interagierte spezifisch mit dem

E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor, die untersuchten Proteinextrakte ergaben keinen Hinweis auf qualitative gewebespezifische Unterschiede, wie z.B. die gewebeabhängige Rekrutierung spezifischer E2F-Familienmitglieder.

Im Southwestern Blot (Abb. 7 und Abb. 8) wurde in Proteinextrakten aus glialen U373 MG sowie endothelialen HMEC-1 Zellen ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa detektiert, das mit dem ODN analog zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor interagiert. Das Molekulargewicht entsprach dabei der höhermolekularen von zwei im Southwestern Blot nachgewiesenen E2F-2 Varianten. Es konnte auch gezeigt werden, dass das ODN nicht mit einem Protein im Bereich des Molekulargewichts von E2F-1 interagiert. Dies liefert einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der Interaktion zwischen E2F-2 und dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor und bestätigt damit das Ergebnis des EMSA.

Neben der genannten Bindung des ODN an Proteine des Molekulargewichts von ca. 50 kDa waren weitere Signale durch Interaktion mit niedermolekularen Proteinen unter 37 kDa zu erkennen, deren molekulare Identität unbekannt bleibt. Es könnte sich bei diesen Proteinen um weitere bekannte oder noch unbekannte E2F-Familienmitglieder, um DP oder aber auch um unspezifische Protein-DNA-Interaktionen handeln.

Im EMSA wird die Interaktion von Proteinen zu relativ kurzen ODN untersucht. Die eingesetzten doppelsträngigen ODN sind aus künstlich hergestellten DNA-Molekülen zusammengesetzt. Da bekannt ist, dass die Interaktionen eines DNA-bindenden Proteins mit einer isolierten DNA-Sequenz nicht die komplexeren Interaktionen im gesamten Promotor widerspiegeln muss, ergeben sich dadurch gewisse Einschränkungen für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation *in vivo*. Durch die Bindung von weiteren Faktoren an z.T. weit entfernt liegende Cis-regulatorische Promotorelemente kann die Struktur der DNA verändert und das Bindungsverhalten eines weiteren Faktors stark beeinflusst werden. Der große Vorteil des EMSA besteht aber in der Möglichkeit, das DNA-bindende Protein durch Einsatz von Antikörpern und ggf. Darstellung eines *Supershifts* aus Proteingemischen wie Gewebeextrakten zu identifizieren.

Ein sog. DNase *footprint* wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Bindungsstellen für DNA-bindende Proteine in einem größeren Promotorkontext zu identifizieren. Methodisch wird dabei ausgenutzt, dass DNA durch an sie bindende Proteine vor dem Abbau durch DNasen geschützt ist [136].

Eine Einschränkung beider Methoden (EMSA und *footprint*) besteht darin, dass die Promotoren nicht im Zusammenhang mit Chromatin untersucht werden. Es ist bekannt, dass neben der Basensequenz eines Promotors die Chromatinstruktur sowie der Methylierungsstatus eines Promotors entscheidenden Einfluss auf transkriptionelle Aktivität haben können. Um zu untersuchen, welche Promotoren im Chromatin einen bestimmten Transkriptionsfaktor rekrutieren können, wird die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eingesetzt. Dabei erfolgt nach einem DNA-Protein *crosslink* die Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen einen bestimmten Transkriptionsfaktor. Die aufgrund des *crosslinks* ko-präzipitierte genomische DNA wird mittels PCR amplifiziert, wobei Primer spezifisch für Kandidatenpromotoren eingesetzt werden. Prinzipiell kann die putative Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors an allen Promotoren, Enhancern und Silencern des Gesamtgenoms untersucht werden. Mittels ChIP werden Promotoren identifiziert und nicht einzelne Cis-Elemente, da bei dieser Methode die DNA mittels Schallwellen in Abschnitte von ca. 500-1000 bp fragmentiert wird, was die Auflösung dieser Methode determiniert [137, 138]. Die aus den Ergebnissen der hier durchgeführten EMSA und Southwestern Blot Analysen abgeleitete Interaktion von E2F-2 mit den ECE-1 Promotoren könnte mittels ChIP im Chromatin der hier untersuchten Zellen bestätigt werden.

7.1.3 Individuelle Funktion einzelner E2F-Familienmitglieder

Nach den in 7.1.1 und 7.1.2 diskutierten Ergebnissen handelt es sich bei dem ECE-1b sowie dem ECE-1c Promotor um für E2F-2 spezifische Zielstrukturen. Dies ist interessant, da gegenwärtig diskutiert wird, ob die einzelnen aktivierenden E2F-Familienmitglieder redundante Funktionen haben und damit identische Zielgene regulieren oder ob sie individuell die Expression von bestimmten Genen steuern können. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit ein Beispiel für ein spezifisch durch E2F-2 reguliertes Zielgen.

Es existieren in der Literatur zwei Modelle der Regulation von E2F-Zielgenen. Das erste geht von einem „Pool transkriptioneller Aktivität“ von E2F-1, E2F-2 und E2F-3 aus, wobei die einzelnen Faktoren redundante Funktion auf die Zielgene ausüben [139]. Dabei wird postuliert, dass ab einem bestimmten Schwellenwert insgesamt zunächst die Proliferation gesteigert und ab einem höheren Schwellenwert die Apoptose induziert wird [95]. Gewebespezifische Unterschiede in der Regulation der Genexpression durch einzelne E2Fs wären in diesem Modell durch ein unterschiedliches Expressionsniveau

der einzelnen Faktoren erklärbar [139]. Passend zu diesem Modell konnten mittels ChIP keine spezifischen Konsensussequenzen für einzelne E2F/DP-Komplexe nachgewiesen werden [95]. Ein zweites Modell geht davon aus, dass die drei E2F-Familienmitglieder teilweise zwar identische, aber außerdem einige spezifische Zielgene haben [139].

Die molekularen Umstände, die zu der im EMSA und Southwestern Blot beobachteten spezifischen Bindung von E2F-2 an die untersuchten Bindungsstellen in den ECE-1 Promotoren führen, wurden nicht genauer untersucht. Es ist aber aufgrund der experimentellen Bedingungen anzunehmen, dass die Spezifität durch die Nukleotidsequenz vermittelt wird. Da im EMSA die Bindung an ein lediglich 25 bp langes ODN untersucht wurde, ist die Beeinflussung durch einen an ein weiter entfernt lokalisiertes Promotorelement bindenden Faktor keine Erklärung. Auch *DNA-bending* (DNA-Biegung), das durch Konformationsänderungen eines Promotors zu einer Beeinflussung von weiteren Promotorelementen führt, kommt bei der Größe des eingesetzten ODN nicht in Betracht. Da auch im Southwestern Blot, in dem alle Proteine als Monomer und aus Komplexen mit anderen Proteinen befreit vorliegen, die Bindung an ein 50 kDa großes Protein mit gleichem Molekulargewicht wie E2F-2, jedoch keine Bindung an ein Protein mit einem Molekulargewicht entsprechend E2F-1 nachgewiesen werden konnte, ist die beobachtete spezifische Interaktion nicht von der Bindung an ein anderes regulatorisches Protein, wie z.B. Rb, abhängig.

7.1.4 Funktionelle Bedeutung des E2F-Bindungsmotivs für die ECE-1c Promotoraktivität

Mittels Reporteragen Assay konnte gezeigt werden, dass der Austausch von zwei Basen im E2F-Bindungsmotiv des ECE-1c Promotors in mikrovaskulären HMEC-1 Endothelzellen zu einer Reduktion der Promotoraktivität auf 16% der Wildtyp-Promotoraktivität führte. Eine Hemmung der Promotoraktivität auf 25% der Wildtyp-Aktivität konnten wir bereits vorher für die endotheliale Zelllinie EA.hy 926 zeigen [92]. Dieses Ergebnis bestätigt die funktionelle Bedeutung dieses Promotorelements für die Transkription von ECE-1c in vaskulären Endothelzellen.

In EA.hy 926 wurde ein transkriptioneller Startpunkt unmittelbar 3' der E2F-Bindungsstelle bestimmt [83]. Die funktionelle Bedeutung des E2F-Bindungsmotivs im ECE-1c Promotor könnte seine Beteiligung an der Initiation der Transkription, etwa durch Interaktion mit generellen Transkriptionsfaktoren, sein. Für den Promotor des

Dihydrofolat-Reduktase-Gens konnte beispielsweise eine für die Promotoraktivität entscheidende Bindung von E2F an die Initiatorsequenz gezeigt werden [140].

Datenbankanalysen der mutierten E2F-Bindungsstelle zeigten zunächst, dass durch die Mutation das E2F-Bindungsmotiv verloren geht. Dagegen zeigten die mit dem mutierten ODN und Extrakten aus den endothelialen Zelllinien EA.hy 926 und HMEC-1 durchgeführten EMSA und Supershift-Assays jedoch weiterhin eine Bindung von E2F-2. Eine unspezifische Bindung des E2F-2-Antikörpers erscheint unwahrscheinlich, da andere Antikörper des gleichen Isotyps keinen Supershift bewirkten. Die verfügbaren Datenbanken enthielten zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeiten offenbar nicht alle DNA-Sequenzen, an die E2F-2 binden kann.

Eine im EMSA erkennbare verminderte Bindungsaffinität von E2F-2 an die Promotorsequenz scheidet jedenfalls als Erklärungsmöglichkeit für die Ergebnisse des Reportergen Assays aus. Eine mögliche Erklärung für die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass die eingefügten Mutationen das intrinsische DNA-*bending* im Chromatin unterschiedlich beeinflussen [141, 142] und dadurch die Promotoraktivität vermindern. Auch wäre es möglich, dass die Affinität von E2F-2 zwar unter den experimentellen Bedingungen des EMSA erhalten bleibt, im Gesamtzusammenhang des Promotors jedoch verändert ist. Die Durchführung oben genannter ChIP Experimenten könnte diese Hypothese prüfen.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Überexpression von E2F-2, allerdings auch die von E2F-1, zu einer Erhöhung der Promotoraktivität führt. Die Steigerung der Promotoraktivität durch E2F-2 passt sehr gut zu seiner Bindung an den Promotor im Bereich des Transkriptionsstartpunkts. Die Induktion der Promotoraktivität auch durch E2F-1 könnte hier artifiziell durch die starke Überexpression bedingt sein, die unter normalen Bedingungen nicht vorkommt, dies könnte man allerdings auch für E2F-2 nicht ausschließen. Weiterhin ist es möglich, dass die endogene E2F-2 Expression durch E2F-1 Überexpression stimuliert wird, welches dann wiederum den ECE-1c Promotor induziert. Der E2F-2 Promotor enthält selbst E2F-Bindungsmotive und es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der drei aktivierenden E2F-Familienmitglieder E2F-1, -2 und -3 die Aktivität des E2F-2 Promotors erhöhen kann [143].

7.1.5 Bindung von putativen E2F-2 Varianten an den ECE-1c Promotor

Im EMSA mit Proteinextrakten aus Gliosarkom (HW) und Meningeom (RD) stellte sich die Bindung von E2F-2 zum polymorphen E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor aus beiden Geweben etwa gleichstark dar, wobei wie in 7.1.1 diskutiert die Interaktion mit dem ODN -338A stärker war als mit dem ODN -338C. Vergleicht man nun die Bindung an den ECE-1b Promotor mit der an den ECE-1c Promotor, zeigte sich im Gliosarkom eine stärkere Bindung von E2F-2 an die Bindungsstelle im ECE-1c Promotor, im Meningeom dagegen eine gegenüber dem ECE-1b Promotor verminderte Bindung an den ECE-1c Promotor (Abb. 10 und Abb. 11). Da die Analysen jeweils auf demselben Gel durchgeführt wurden, ist ein Vergleich der Bindungsstärke zulässig. Das Ergebnis spricht für eine unterschiedlich starke, tumorspezifische Affinität von E2F-2 zu dem untersuchten ECE-1c Promotorabschnitt.

Bei der Analyse der E2F-2 Expression im Western Blot wurden zwei Signale bei etwa 50 kDa und 48 kDa detektiert. Das Expressionsverhalten dieser Molekulargewichtsformen war in den untersuchten Tumorgeweben und Zellen variabel (Abb. 17 und Tab. 7). Vergleicht man diese Signale aus dem Gliosarkom (HW) mit denen aus dem Meningeom (RD) fällt auf, dass im Gliosarkom die beiden Molekulargewichtsformen ungefähr gleich stark nachweisbar waren, während sich im Meningeomgewebe nur die 48 kDa große E2F-2 Form nachweisen ließ (Abb. 17). In der neuroblastären Zelllinie SK-N-MC war die E2F-2 Variante von 48 kDa stärker exprimiert als die Variante bei 50 kDa, wobei im EMSA eine stärkere Affinität zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1b Promotor als zu dem im ECE-1c Promotor bestand (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse könnten durch eine höhere Affinität der E2F-2 Variante von 50 kDa zum E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor bedingt sein.

Für die Bindung der E2F-2 Variante von 50 kDa an das E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor spricht auch die Southwestern Blot Analyse. Dabei zeigte sich eine Interaktion zwischen dem ODN analog zur E2F-Bindungssequenz und einem 50 kDa großen Protein aus U373 MG sowie HMEC-1 Zellen. Das Molekulargewicht dieses Proteins entsprach dem Molekulargewicht einer oberen von zwei E2F-2 Varianten. Möglicherweise bewirkt eine noch zu bestimmende Modifikation von E2F-2 die Bindungsaffinität zu bestimmten DNA-Sequenzen, die im Zusammenhang mit den Untersuchungen in dieser Arbeit durch die E2F-Bindungssequenz im ECE-1c Promotor repräsentiert wird. Theoretisch könnte es sich bei E2F-2 von 50 kDa um eine

posttranslationale Modifikation des 48 kDa, eine konformationelle Variante oder bei der 48 kDa großen Form um ein Proteolyseprodukt des 50 kDa großen Proteins handeln. Die Literaturrecherche ergab Molekulargewichte von E2F-2 Varianten von ca. 48 bis 74 kDa [144-146]. Phosphorylierung wurde bisher nur für E2F-1 beschrieben, eine theoretisch mögliche Phosphorylierung von E2F-2 konnte durch Phosphatase-Experimente (nicht gezeigt) jedoch weitgehend ausgeschlossen werden. Andere denkbare Modifikationen (z.B. Acetylierung oder Glykosylierung) wurden nicht untersucht.

Die Hypothese einer präferenziellen Bindung des E2F-2 von 50 kDa an das Cis-Element im ECE-1c Promotor wird indirekt gestützt durch die Beobachtung, dass in den drei Tumorproben mit fehlendem Nachweis des E2F-2 von 50 kDa im Western Blot die geringsten ECE-1 Proteinmengen gefunden wurden (Tab.11). Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Tumoren ist es allerdings nicht möglich, eine statistisch signifikante Korrelation einer geringen oder fehlenden E2F-2 p50 Expression mit einer geringen ECE-1 Expression nachzuweisen. Auch konnte mangels verfügbarer spezifischer Antikörper keine Analyse der isoformspezifischen ECE-1 Expression durchgeführt werden.

7.1.6 Extraktion von Kernproteinen

Die Analyse nukleärer Proteine in zytosolischer und nukleärer Proteinfraction erfolgte zur Qualitätskontrolle der Kernextraktion. Dabei war CBF-A aus Zellen und Tumorgewebe im Western Blot sowie im EMSA in der nukleären Fraktion nachweisbar. In der Literatur ist auch für die aktivierenden E2F-Familienmitglieder eine rein nukleäre Lokalisation beschrieben [147]. Im Western Blot ließen sich E2F-1 und E2F-3 aus den Zelllinien U373 MG, Kelly und EA.hy 926 überwiegend in der nukleären Fraktion nachweisen. Die Anreicherung von bekannterweise ebenfalls nukleär lokalisiertem E2F-2 in der Kernfraktion erwies sich als deutlich schwieriger. E2F-2 ließ sich im Western Blot in den untersuchten fraktionierten Proteinextrakten aus Zellen und Gewebe nur bzw. überwiegend im Zytosol detektieren. Im EMSA konnte die Bindung von E2F-2 aus Tumorgewebe nur mit der zytosolischen Proteinfraction gezeigt werden. In den Zelllinien SK-N-MC und U373 MG zeigte zytosolisches E2F-2 zwar eine stärkere Bindung an das ODN entsprechend dem E2F-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor, aber auch E2F-2 aus der Kernfraktion interagiert mit dem ODN. Es kam offensichtlich während der Kernextraktion, v.a. aber bei der Aufarbeitung von

Kryogewebe zu einem „Leckstrom“ von nukleären Proteinen in das Zytosol, der faktorabhängig variabel war und in erster Linie E2F-2 betraf. Daher mussten immer beide, nukleäre und zytosolische Fraktion, in EMSA analysiert werden. Dabei zeigte sich mit Antikörpern gegen E2F-1 und E2F-3 in keiner untersuchten nukleären oder zytosolischen Proteinfractionen aus Zelllinien oder Gewebe ein Supershift.

Auch in der Immunzytologie war in U373 MG neben einem deutlichen nukleären ein schwächeres, aber erkennbares zytosolisches Signal mit dem Anti-E2F-2 Antikörper detektierbar. Eine unspezifische Interaktion des Primärantikörpers mit einem Bestandteil des Zytosols kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Andererseits ist es auch hier möglich, dass es bei unzureichender Fixierung zu einem „Leckstrom“ von E2F-2 aus dem Kern ins Zytosol kam.

Eine mögliche Erklärung ist eine reale zytoplasmatische Lokalisation von E2F-2. Hinweise auf eine zytosolische Lokalisation von E2F-2 fanden sich in der Literatur jedoch nicht. E2F-1 hingegen konnte in Virus-infizierten Zellen [144, 148], unter bestimmten Bedingungen bei adenoviraler Überexpression [149] und im Hirngewebe von Alzheimerpatienten, nicht aber im Kontrollgewebe [150] im Zytosol nachgewiesen werden.

7.2 ECE-1 als mögliches Zielgen einer alterierten Rb-Signaltransduktion

ECE-1b und ECE-1c stellen nach den Ergebnissen dieser Arbeit in Gliomen und Meningeomen ein Zielgen von E2F-2 dar. Die aktivierenden E2F-Familienmitglieder werden posttranslational durch Rb reguliert, wobei durch zellzyklusabhängige Phosphorylierung von Rb das Dimer aus E2F und DP freigesetzt wird und es zu einer erhöhten Transkriptionsrate von E2F regulierten Genen kommt. Wird Rb vermindert exprimiert, wird die Transkriptionsrate der E2F-Zielgene ebenfalls gesteigert [7]. Rb oder Elemente seines Signaltransduktionswegs sind in Glioblastomen sehr häufig alteriert. Normalerweise lösen auf eine Zelle einwirkende Wachstumsstimuli eine Steigerung der *Cyclin D* Expression aus. *Cyclin D* führt im Komplex mit *cyclin dependend kinase 4* (Cdk4) zur Phosphorylierung von Rb und letztendlich zur Expressionssteigerung von E2F-Zielgenen. Methylierung des Rb-Promoters und dadurch verminderte Rb-Expression ist in 43% der sekundären und in 14% der primären Glioblastome zu beobachten. Das Protein *p16 (INK4a/ CDKN2A)* bindet normalerweise Cdk4 und hemmt damit den Komplex aus Cdk4 und *Cyclin D1*. Eine

homozygote Deletion des p16 codierenden Chromosomenabschnitts beobachtet man in mindestens 30 bis 40% der primären, in ca. 20% der sekundären Glioblastome und in ca. 10% der anaplastischen Astrozytome. Inaktivierung von Rb oder Verlust der Heterozygotie des Rb codierenden Chromosomenabschnitts wird in 20% bis 40% der Glioblastome, Amplifikation und Überexpression des Cdk4 Gens in 12% bis 15% beschrieben. Amplifikation von Cdk4 und Verlust von Rb kommen etwa gleich häufig bei primären und sekundären Glioblastomen vor [151]. Nur 6% (7 von 120) der in einer Studie untersuchten Glioblastome zeigten keine genetische Veränderung von Rb, Cdk4 oder p16 [152].

Die Identifizierung von E2F-Zielgenen wird in der Literatur als wichtig beschrieben, um die molekularen Mechanismen hinter der biologischen Funktion von Rb zu verstehen [96]. Bei ECE-1 könnte es sich daher um ein Gen handeln, das bei alteriertem Rb-Signaltransduktionswegs verstärkt exprimiert wird. Eine weiterführende Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen ECE-Expression und veränderter Rb-Signaltransduktion besteht, erscheint daher sinnvoll.

7.3 Spezifische Interaktion von CBF mit seinem Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch CBF-A aus neuroblastären Zelllinien spezifisch an den ECE-1c Promotor bindet. Eine spezifische Interaktion von CBF mit der CCAAT Box im ECE-1c Promotor konnten wir bereits in der endothelialen Zelllinie EA.hy 926 nachweisen [92]. Es konnte damit für den ECE-1c Promotor sowohl eine spezifische Interaktion mit E2F-2 als auch mit CBF gefunden werden.

CCAAT-Boxen sind in 25 bis 30% aller Promotoren vorhanden, wobei sie noch häufiger, meist in reverser Orientierung in Promotoren ohne TATA Box, wie dem ECE-1c Promotor, vorkommen. Regulation von Promotoren zugleich durch E2F und CBF ist bekannt. Insbesondere die Transkription Zellzyklus-regulierter und Zellzyklus-regulierender Gene wird häufig durch E2F und oft in Kooperation mit CBF gesteuert [125]. Oft finden sich in diesen Promotoren auch Konsensussequenzen für Sp1 [153]. Sp1 ist in der Lage die DNA-Struktur zu verändern und dadurch weiter oberhalb bindende Faktoren näher an den basalen Transkriptionsapparat zu bringen. Es kann dabei direkt mit anderen Proteinen wie E2F interagieren und die Transkription aktivieren, und es bindet häufig an Promotoren ohne TATA-Box [136]. Im EMSA konnten wir in einer früheren Studie die Bindung eines Proteins aus endothelialen

Zellen an das Sp1-Bindungsmotiv im ECE-1c Promotor zeigen [92]. Die Hauptfunktion von CBF wird darin gesehen, synergistisch mit anderen TFs zu interagieren. Derartige synergistische Funktionen können über *DNA-bending* und direkte Protein-Protein-Interaktionen, wie mit generellen Transkriptionsfaktoren oder anderen Transkriptionsfaktoren, vermittelt sein. CBF kann mit Histon Acetylasen interagieren und die umgebende Chromatinstruktur beeinflussen [125, 127]. Aus der Literatur ist für CBF-A ein Molekulargewicht von 30-32 kDa bekannt [126, 154-156]. In allen untersuchten Hirntumoren war CBF-A in Form eines 30 kDa großen Proteins nachweisbar, allerdings wurde es in einigen Tumorgeweben nur schwach exprimiert. In einigen Tumoren war ein kleineres Protein von 24 kDa nachweisbar. Da das aus der Literatur bekannte Molekulargewicht bei ca. 30 kDa liegt, bleibt die Bedeutung dieser weiteren detektierten Banden sowie der Expressionsunterschiede unklar. CBF bindet als Trimer an DNA. Es konnte gezeigt werden, dass CBF zellzyklusabhängig reguliert wird. Dies kommt durch Acetylierung der Untereinheit CBF-B zustande. Die beiden anderen Untereinheiten, also auch CBF-A, werden von den meisten Autoren als konstant exprimiert angesehen [125].

7.4 Expressionsanalyse von Transkriptionsfaktoren

7.4.1 Probenmaterial

Die Untersuchung von humanem Gewebe erlaubt im Gegensatz zu Zellkultur- und Tiermodellen den direkten Einblick in die menschliche Pathologie und liefert damit im besten Fall unmittelbar für diagnostische und therapeutische Zwecke verwertbare Erkenntnisse. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Gewebeproben aus Resektaten humaner Hirntumoren untersucht. Die Untersuchung von aus therapeutischen Gründen entferntem Tumormaterial beinhaltet jedoch auch gravierende Einschränkungen, die die Gewinnung und Auswertung der Daten erschweren. Ob es sich bei dem Material ausschließlich um solides Tumorgewebe handelt, wurde nicht hinreichend überprüft. Insbesondere Glioblastome haben eine sehr heterogene Histomorphologie mit unterschiedlichem Tumorzell-, Gefäß- und Nekroseanteil [2, 3]. Die uns zur Verfügung gestellten operativ entfernten Tumoranteile können sich in ihrer Zusammensetzung stark unterschieden haben. Weiterhin wurden sehr unterschiedliche Tumorentitäten untersucht, und die Tumoren waren teilweise schon chemo- oder radiotherapeutisch behandelt worden. Von den Astrozytomen des WHO Grads IV wurde

mit fünf Tumoren zwar die größte Anzahl einer Entität untersucht, einschränkend ist aber festzustellen, dass differenzierte anamnestische Angaben, ob es sich um primäre (de novo entstandene) oder sekundäre (aus geringergradigen Astrozytomen hervorgegangene) Glioblastome handelte, nicht vorlagen. Es wurde jedoch beschrieben, dass primäre und sekundäre Glioblastome sich genetisch unterscheiden [4]. Die histologische Diagnose der Astrozytome richtet sich nach dem Tumoranteil mit dem höchsten Malignitätsgrad [5]. In einem Tumor könnten daher einerseits Areale geringeren Grades vorhanden sein, die das Expressionsniveau im Gesamtgewebe beeinflussen, andererseits könnten auch höhergradigere Areale der Diagnostik entgangen sein. Die zunehmende Kenntnis der molekularen Pathomechanismen der Tumorgenese ist bisher noch nicht in die Klassifikation der Astrozytome eingeflossen [3]. Die genannten Einschränkungen machen Entitäts- bzw. Tumorgrad-spezifische Aussagen über Expressionsunterschiede praktisch unmöglich. Hier ist eine wesentlich höhere Anzahl an Gewebeproben und die Standardisierung nach oben genannten Variablen zu fordern. Ein weniger heterogenes Spektrum an Tumorentitäten wäre unbedingt nötig. Daher sind die vorgelegten Ergebnisse über die Proteinexpression im Wesentlichen deskriptiver Art.

7.4.2 Expression von E2F-1 in Hirntumoren und Zelllinien

7.4.2.1 Expression von E2F-1 Varianten in humanen intrazerebralen Tumoren

Bei der Expressionsanalyse von E2F-1 mittels Western Blot detektierte der eingesetzte Antikörper Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts. Die Literaturrecherche ergab für E2F-1 in humanen Zellen und Geweben Molekulargewichte zwischen ca. 45 bis 69 kDa (Tab. 12). Unter Berücksichtigung dieser E2F-1 Molekulargewichtsvarianten konnten wir in allen untersuchten Tumoren die Expression von mindestens einer E2F-1 Variante zeigen. Eine Assoziation zwischen Tumorentität und Detektion bestimmter Varianten war nicht erkennbar.

Tab. 12 Molekulargewicht von E2F-1 in der Literatur

E2F-1 Variante in kDa	Spezies	Zell- bzw. Gewebeart	Referenz
60	Mensch	gliale Zelllinien (rekombinantes E2F-1)	[157]
69	Mensch	Daudi Zellen (Burkitt Lymphom)	[158]
3 Banden um 60	Maus	Fibroblasten	[159]
Doppelbande um 60	Mensch	HL 60 Zellen (humane Leukämiezellen)	[160]
Doppelbande bei 60	Mensch	HIV-1 infizierte HeLa Zellen (Zervixadenokarzinom)	[144]
ca. 45, schwach bei 67	Mensch	HEL (<i>human embryonic lung</i>) Fibroblasten	[144]
< 68	Mensch	<i>cerebellar granule neurons</i> (zerebelläre neuronale Zellen)	[161]
~ 60, z.T. auch 50	Mensch	Magenkarzinom	[162]
Banden-Triplets: 62, 65, 70 bzw. 55, 58, 60	Maus	Embryonales und adultes Gehirn	[145]
50	Mensch	Frontalhirn	[163]
diverse Banden zwischen 55-77	Maus	Embryonale und adulte Gewebe (Leber, Gehirn, Gaumen, Zunge, Herz)	[146]

7.4.2.2 Posttranslationale Modifikationen als mögliche Erklärung der E2F-1

Varianten

Posttranslationale Modifikationen sind eine mögliche Erklärung für die E2F-1 Varianten. Die E2F-1-Aktivität wird nicht nur durch die in der Einleitung beschriebene Bindung an *pocket* Proteine und deren Phosphorylierungsstatus, sondern auch durch Phosphorylierung von E2F-1 selbst reguliert. Während der S- und G₂-Phase führt diese zu einer verminderten DNA-Affinität und Transaktivierung [164-166]. Phosphorylierung prädisponiert außerdem zur Degradierung [167] oder erhöht als Antwort auf DNA-Schädigung die Stabilität von E2F-1 [168] und die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen [169]. Phosphorylierung kann ferner die Affinität zu Rb vermindern [170] oder erhöhen [159, 171]. Es wird deutlich, dass abhängig vom Kontext sowie von der Phosphorylierungsstelle diese Modifikationen unterschiedliche Konsequenzen haben. Insgesamt kann alleine aus dem Molekulargewicht detektierter E2F-1 Signale nicht auf deren Genese und die funktionelle Bedeutung rückgeschlossen werden. Obwohl Phosphorylierung von E2F-1 bekannt ist, könnten auch andere posttranslationale Modifikationen zugrunde liegen. Es gibt bisher keinen Hinweis auf die Existenz von Spleißvarianten oder von bisher nicht identifizierten alternativen Promotoren. Eine unspezifische Bindung des Anti-E2F-1 Antikörpers ist als Erklärung der verschiedenen Signale nicht auszuschließen.

Dass es diverse Molekulargewichtsvarianten insbesondere für E2F-1 gibt, verdeutlicht die Expressionsanalyse der E2F-Familienmitglieder in embryonalen und adulten

Gewebe der Maus. Es wurden zahlreiche E2F-1 Varianten mit unbekannter Funktion beschrieben. Interessanterweise ergab sich, entgegen der Erwartung einer im Verlauf der Gewebedifferenzierung abnehmenden E2F-1 Expression, eine Zunahme einer 65 kDa großen E2F-1 Variante im Laufe der Entwicklung, die im adulten Gehirn am stärksten exprimiert war [145, 146].

7.4.3 E2F-3 Expression in intrakraniellen Tumoren und Zelllinien

7.4.3.1 E2F-3 Expression in Hirntumoren

In der Western Blot Analyse ließ sich E2F-3 in Form eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 55 kDa teilweise in Form einer Doppelbande nachweisen. Alle anderen Banden waren schwach oder inkonstant. In der Literatur sind Molekulargewichte von 57 bis 77 kDa beschrieben [145, 146, 160]. Das in dieser Arbeit beobachtete Molekulargewicht von E2F-3 liegt im unteren Bereich der in der Literatur angegebenen Spanne.

Die Doppelbande könnte den Isoformen E2F-3a und -3b entsprechen, die theoretisch beide durch den verwendeten Antikörper detektiert werden würden. Diese zweite E2F-3 Isoform, E2F-3b, konnte in Mausfibroblasten und in humanen Leukämiezellen nachgewiesen werden. Die Expression der beiden Isoformen wird über einen alternativen Promotor reguliert, wobei E2F-3b kürzer ist [104] und in den Tumorextrakten dem niedermolekularen Signalen entsprechen könnte. Es wurde allerdings beschrieben, dass auch ein amino-terminaler Antikörper, der theoretisch nur E2F-3a erkennen sollte, zumindest im embryonalen und adulten Gehirn der Maus ebenfalls zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 57 und 61 kDa erkennt [145].

7.4.3.2 Defiziente Expression von E2F-3 in höhergradigen Astrozytomen

Auffällig war der fehlende Nachweis der Expression von E2F-3 in drei von sieben untersuchten Astrozytomen (WHO Grad II bis IV), obwohl das Protein in allen untersuchten Meningeomen und Oligodendrogliomen sowie in einem pilozytischen Astrozytom und in der nicht-neoplastisch veränderten Hirnrinde nachgewiesen wurde.

Die fehlende Expression von E2F-3 in den höhergradigen Astrozytomen sollte durch die Analyse einer größeren Anzahl Tumorgewebe und durch den Vergleich mit nicht-neoplastisch verändertem Hirngewebe weiter untersucht werden. Ob eine funktionelle Relevanz der fehlenden E2F-3 Expression in den höhergradigen Gliomen bleibt unbekannt.

Aus Expressionsanalysen im Mausmodell wurde bereits die Hypothese abgeleitet, dass E2F-3 für die Differenzierung des Gehirns wichtig ist. Hier kommt es im Laufe der Entwicklung zu einer Zunahme der Expression einer 57 kDa E2F-3 Variante sowie zur Abnahme einer 61 kDa großen E2F-3 Variante [145].

Bei einigen extrakraniellen humanen Tumorerkrankungen ist eine veränderte Expression von E2F-3 bekannt. Bei der Untersuchung von gastrointestinalen Tumoren wurde eine verminderte Expression von E2F-3 mRNA in 70% der Magenkarzinome und in 20% der kolorektalen Karzinome im Vergleich zu nicht neoplastisch verändertem Gewebe nachgewiesen [162]. Dagegen konnte in humanen Blasentumoren eine Überexpression von E2F-3 nachgewiesen werden [172], wobei die Stärke der Expression mit dem Tumorgrad und der Proliferation der Tumorzellen positiv korrelierte [173]. Beim Prostatakarzinom korrelierte die Überlebenszeit negativ mit der E2F-3 Expression [174].

Die Vermutung, dass die aktivierenden E2F-Familienmitglieder bei Tumorerkrankungen eine wichtige Bedeutung haben, leitet sich vom Phänotyp der E2F *Knockout* Mäuse ab, wo den Transkriptionsfaktoren abhängig vom Kontext eine Rolle sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor zugeschrieben wird. Diese scheinbar entgegengesetzte Funktion lässt sich anhand der Beobachtungen bei Rb heterozygoten Mäusen verdeutlichen. Fehlt hier zusätzlich E2F-3, ist die Überlebenszeit im Vergleich zu reinen Rb heterozygoten Mäusen signifikant verlängert, da die Entwicklung von Hypophysentumoren supprimiert wird. Andererseits wird die Entwicklung und Progression medullärer Schilddrüsentumoren gesteigert und es wurden zusätzliche, in Rb Heterozygoten nicht beobachtete Tumorformen, gefunden [175].

7.4.4 Korrelation der Expression verschiedener E2F-Familienmitglieder

Vergleicht man die Expression der einzelnen E2F-Familienmitglieder in den untersuchten Tumorextrakten fällt auf, dass Tumoren, die E2F-1 (55 kDa) nicht exprimieren, auch E2F-2 (50 kDa) entweder nicht oder nur schwach exprimieren. Nur mit einer Ausnahme exprimieren diese Tumoren auch kein E2F-3. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar und die Untersuchung einer größeren Zahl der jeweiligen Tumorentitäten zur weiteren Validierung ist erforderlich. Möglich ist, dass in diesen Geweben die E2F-Familienmitglieder ihre Expression gegenseitig regulieren bzw. die gleichen Faktoren die Expression aller drei E2F-Familienmitglieder bestimmen.

7.4.5 Proteinexpression von GATA-2 und GATA-3

Da sich in den ECE-1c und ECE-1b Promotoren GATA-Bindungsmotive befinden, die Überexpression von GATA-2 in humanen endothelialen Zelllinien eine Erhöhung der ECE-1c-Promoter-Aktivität hervorrief [92] und GATA-2 und GATA-3 im zentralen Nervensystem zumindest während der Entwicklung exprimiert werden [115-118], haben wir die Expression und DNA-Bindung dieser Faktoren in den uns verfügbaren Tumoren und Zelllinien untersucht. Die beiden Transkriptionsfaktoren konnten auf Proteinebene nicht detektiert werden, eine Interaktion mit dem GATA-Bindungsmotiv im ECE-1c und im ECE-1b Promotor konnte mittels EMSA ebenfalls nicht nachgewiesen werden. GATA-2 und GATA-3 scheinen somit für die Transkription von ECE-1b und ECE-1c in humanen zerebralen Tumoren nicht relevant zu sein, wenn man von der Möglichkeit eines falsch-negativen Ergebnisses aufgrund zu geringer Sensitivität absieht.

7.5 Therapeutische Implikationen

7.5.1 Endothelinsystem als therapeutisches Target bei Tumorerkrankungen

Expression des Endothelinsystems ist bei verschiedenen Tumorerkrankungen, z.B. bei Prostata-, Mamma- und Ovarialkarzinom, gezeigt worden und wurde funktionell mit Proliferation, Apoptosehemmung, Angiogenese und Tumorerkrankung assoziiert. Therapeutisch wurde der ET_A-Rezeptorblocker Atrasentan bereits erfolgreich beim hormonrefraktären Prostatakarzinom mit Knochenmetastasen in der klinischen Phase III getestet [176]. Expression von Komponenten des Endothelinsystems wurde auch in glialen und meningealen Tumoren nachgewiesen [46]. Eine klinische Prüfung des therapeutischen Potentials einer pharmakologischen ET_A-Blockade bei glialen und meningealen Tumoren des Menschen wurde bisher nicht publiziert. Die beschriebene immunhistochemische Korrelation der Expression von ET-1 mit dem Malignitätsgrad von glialen Tumoren [50] könnte auch auf den hohen Vaskularisationsgrad von Glioblastomen [2, 46] zurückzuführen sein und muss daher die schlechtere Prognose nicht kausal bedingen. Zwar kann ET-1 Astrozyten in Zellkultur zur Proliferation anregen und antiapoptotisch wirken, die funktionelle Rolle des Endothelinsystems bei glialen Tumoren in vivo ist aber noch ungeklärt. Somit ist das therapeutische Potential der Inhibition des Endothelinsystems bei Gliomen zurzeit noch nicht abzusehen.

7.5.2 ECE als therapeutische Zielstruktur

ECE nimmt im Syntheseweg der ETs eine zentrale Stelle ein, so dass seine selektive Hemmung zur therapeutischen Beeinflussung des Endothelinsystems genutzt werden könnte. Über die funktionelle Bedeutung von ECE-1 in humanen Glioblastomen ist bisher wenig bekannt. Außerdem ist unklar, ob neben BigET noch andere Substrate von ECE-1 umgesetzt werden [79, 80]. In vitro konnte die Proliferation von humanen Glioblastom Zellen durch Zugabe von ECE-1 Inhibitoren nach zwei bis sieben Stunden dosisabhängig gehemmt werden. Exogene Zufuhr von ET-1 oder BigET-1 konnte den Effekt nicht rückgängig machen, was darauf hindeutet, dass entweder ein ET-1 unabhängiger oder ein intrazellulärer Mechanismus für die beobachtete Proliferationshemmung durch ECE-1-Inhibitoren verantwortlich ist [177]. Insgesamt ist die Bedeutung des ECE-1 in gesunden und neoplastischen Strukturen des Nervensystems noch nicht ausreichend bekannt, um das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer möglichen therapeutischen ECE-Inhibition abzuleiten. Im Zusammenhang mit ZNS-Erkrankungen ist bedeutsam, dass ECE-1 in der Maus an der Spaltung von β -Amyloid, welches bei der Alzheimer-Demenz typischerweise in Plaques abgelagert wird, beteiligt ist [79]. Insofern könnte eine chronische Inhibition von ECE-1 ungünstig sein. Über die funktionelle Bedeutung von ECE-2, das bei Rind und Maus vor allem in neuronalen Strukturen nachgewiesen wurde [75], ist wenig bekannt. Es ist dementsprechend nicht absehbar, was eine eventuell auftretende gleichzeitige Hemmung von ECE-2 bewirken würde. Für ECEL-1, das zu 53% mit ECE-1 identisch ist, dessen Funktion aber unbekannt ist, wurde gezeigt, dass eine starke Expression in humanen Neuroblastomen mit einer günstigen Prognose einhergeht [178].

7.5.3 Therapeutische Modulation von E2F-2 und CBF in Hirntumoren

In dieser Arbeit wurde die Protein-DNA-Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit funktionell relevanten ECE-1 Promotorbereichen untersucht, um zu einem besseren Verständnis der Pathogenese neuroepithelialer und meningealer Tumoren zu gelangen und damit mögliche neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass E2F-2 und CBF mit funktionell relevanten ECE-1 Promotorbereichen in Tumoren des Nervensystems interagieren können. Diese beiden Transkriptionsfaktoren stellen damit potentielle therapeutische Zielstrukturen dar, um die Expression von ECE-1c bzw. ECE-1b auf transkriptioneller Ebene in humanen intrakraniellen Tumoren zu beeinflussen.

Praktisch ist es möglich, bestimmte Transkriptionsprodukte durch *antisense-RNA* oder *small interfering RNA (siRNA)*, bzw. Transkriptionsfaktoren durch so genannte Decoy-Oligonukleotide zu beeinflussen. Zur lokalen Therapie wird *antisense-RNA* in der Augenheilkunde bereits eingesetzt. Weitere dieser neuen Therapieansätze, wie z.B. *Decoy-Oligonukleotide* befinden sich bereits in der klinischen Prüfung.

E2F-2 und CBF, die in dieser Arbeit als an den ECE-1 Promotor bindend identifiziert wurden, sind an vielen essentiellen zellulären Prozessen, insbesondere an der Regulation von Zellzyklus-kontrollierenden Faktoren, beteiligt. Die weite Verbreitung der beiden Faktoren macht verständlich, dass es derzeit und wahrscheinlich prinzipiell unmöglich ist, durch einfache Ausschaltung eines Transkriptionsfaktors eine selektive Beeinflussung eines bestimmten einzelnen Promotors zu erreichen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass neben E2F-1 auch E2F-2 die Apoptose induzieren kann [95]. In einer Studie entwickelten reine E2F-2 *Knockout* Mäuse proliferative Erkrankungen. Daraufhin wurde für E2F-2 eine Tumorsuppressorfunktion diskutiert [179]. Eine Ausschaltung von E2F-2 in humanen Tumoren ist daher wahrscheinlich nicht sinnvoll.

Auch CBF wurde als mögliches therapeutisches Target diskutiert, nachdem berichtet wurde, dass drei verschiedene Substanzen mit tumorhemmender Wirkung die Bindung von CBF an CCAAT Boxen hemmen. Ob die Hemmung der DNA-Bindung im Zusammenhang mit der antiproliferativen Wirksamkeit dieser Wirkstoffe steht, ist jedoch unbekannt [123].

Eine gentherapeutische Strategie mit dem Ziel durch Modulation von E2F-2 oder CBF die Expression von ECE-1 zu hemmen und dadurch pathogenetische Faktoren in Hirntumoren zu beeinflussen kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht abgeleitet werden. Die in unserer Untersuchung aufgezeigten spezifischen Interaktionen von E2F-2 und CBF mit ECE-1c Promotorelementen sowie von E2F-2 mit dem ECE-1b Promotor in humanen Tumoren des Nervensystems rechtfertigen jedoch die Durchführung weiterer Experimente, um die spezifische Interaktion von E2F-2 und CBF im Chromatin zu überprüfen und die Regulation und pathogenetische Bedeutung des Endothelinsystems in diesen Tumoren besser zu verstehen.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Insbesondere höhergradige Astrozytome haben eine schlechte Prognose. Ein Verständnis der molekularen Pathogenese dieser Tumoren kann helfen, diese Tumoren einer spezifischen molekularen Therapie zugänglich zu machen.

Humane Tumoren des zentralen Nervensystems exprimieren Komponenten des Endothelinsystems. In Tumoren anderer Organe werden diese Komponenten ebenfalls exprimiert und wurden funktionell mit Proliferation, Angiogenese oder Apoptosehemmung assoziiert. Endothelin-Konvertierungsenzyme sind für die Synthese der Endotheline von entscheidender Bedeutung.

Thema dieser Arbeit war die Untersuchung von Mechanismen der transkriptionellen Regulation von Endothelin-Konvertierungsenzym-1. Das Ziel war es, in humanen glialen und meningealen Tumoren sowie in Zelllinien glialen, endothelialen und neuroblastären Ursprungs mittels EMSA, Southwestern Blot und Reportergen Assay Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die mit den isoformspezifischen Promotoren der Endothelin-Konvertierungsenzyme ECE-1c und ECE-1b interagieren können.

Es ergaben sich die folgenden Ergebnisse und Schlussfolgerungen:

1. Von den in den untersuchten Tumoren exprimierten Transkriptionsfaktoren E2F 1, -2 und -3 interagiert nur E2F-2 spezifisch mit den E2F-Bindungsmotiven im ECE-1b und ECE-1c Promotor. Die Ergebnisse stützen daher das in der Literatur diskutierte Konzept, dass die aktivierenden E2F-Familienmitglieder nicht alle an die gleichen Promotoren binden, sondern auch individuelle Zielgene haben. Der Rb-Signaltransduktionsweg ist häufig in Glioblastomen alteriert. Diese Alteration wirkt sich in erster Linie über die gesteigerte Freisetzung von E2F aus. Der Befund, dass E2F-2 spezifisch mit den E2F-Bindungsmotiven im ECE-1b und ECE-1c Promotor interagiert, läßt uns daher vermuten, dass die beiden Endothelin-Konvertierungsenzyme indirekte Zielstrukturen des alterierten Rb Signaltransduktionswegs darstellen.

2. Die Affinität von E2F-2 zum ECE-1b Promotor wird durch einen natürlichen Polymorphismus beeinflusst. Die klinische Bedeutung dieser Beeinflussung für die Entstehung und Progression glialer und meningealer Tumoren ist jedoch unklar.

3. Der Transkriptionsfaktor CBF interagiert ebenfalls spezifisch mit dem ECE-1c Promotor. Dies deutet darauf hin, dass der ECE-1c Promotor sowohl durch E2F-2 als auch durch CBF reguliert werden kann. Eine gemeinsame Regulation durch CBF und E2F wurde bereits für andere Gene beschrieben.

4. Die funktionelle Bedeutung des E2F-Bindungsmotivs im ECE-1c Promotor konnten wir mittels Reportergen Assay in einer mikrovaskulären endothelialen Zelllinie bestätigen. Dabei führte die Mutation des E2F-Bindungsmotivs zu einer Reduktion der Promotoraktivität auf 16% der Wildtyp-Aktivität. Dies zeigt die Wichtigkeit dieses Bindungsmotivs für die ECE-1c Promotoraktivität. Die Überexpression von E2F-2 führte zu einer weiteren Steigerung der Aktivität des ECE-1c Promotors. Allerdings ließ sich eine verminderte Bindung von E2F-2 an das mutierte Promotorelement im EMSA nicht nachweisen und nicht nur die Überexpression von E2F-2, sondern auch von E2F-1 erhöhte die Promotoraktivität.

5. Aus Tumorproben isolierte Proteine zeigten eine individuell variable Bindungsstärke von E2F-2 zum ECE-1c Promotor. Dies könnte durch Unterschiede in der Expression postulierter E2F-2 Varianten bedingt sein. Eine höhere Bindungsstärke zum ECE-1c Promotor war mit der Expression einer ca. 50 kDa großen E2F-2 Variante verbunden. Im Southwestern Blot zeigte sich eine Bindung der dem Promotorelement entsprechenden DNA-Sequenz nur an ein 50 kDa großes Protein, obwohl neben einer 50 kDa großen Variante von E2F-2 noch weitere Varianten detektierbar waren. Wir nehmen daher an, dass eine Modifikation von E2F-2 die Bindungsaffinität an ein E2F-Bindungsmotiv modulieren kann.

Die Ergebnisse haben wir an einer kleinen Anzahl von sehr verschiedenen Tumoren gewonnen. Eine Überprüfung der Ergebnisse an grösseren Gruppen histologisch klassifizierter Hirntumoren steht aus. Da wir für die Protein-DNA-Bindungsstudien nur Oligonukleotidsequenzen aus den jeweiligen ECE-1 Promotoren untersucht haben,

wären weiterführende Untersuchungen unter Einbeziehung der Chromatinstruktur für die biologische Relevanz der erhobenen Daten von Interesse.

Unsere Ergebnisse vermitteln wichtige Erkenntnisse über die isoformspezifische Regulation von ECE-1b und -1c in humanen Hirntumoren. Obwohl erste Publikationen auf einen proliferationshemmenden Effekt von ECE-1 Antagonisten hinweisen, ist es noch zu früh, die pathophysiologische Bedeutung von ECE-1 bei Hirntumoren bewerten zu können.

9 LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONEN

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

Publikationen

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 house-keeping promoter modulated by polymorphic microsatellites. *J Hypertens.* 21 (11): 2111-24

Bremer J, Funke-Kaiser H, Kassab-Bachi A, Synowitz M, Sack U, Paul M (2004): Analysis of transcription factors in human intracranial tumors - functional relation to the endothelin system. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130 Supplement: S 158-9

Kassab-Bachi A, Behrouzi T, Funke-Kaiser H, Bremer J, Synowitz M, Sack U, Paul M (2004): Expression of the endothelin system in human intracranial tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 130 Supplement: S 161

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Weller M: Interdisziplinäre S 2 – Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Gliome des Erwachsenenalters. München, W. Zuckschwerdt Verlag GmbH; 2004.
2. Kleihues P, Cavenee, WC, Webster, K: World Health Organisation Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumors of the Nervous System. Lyon, IARC Press; 2000.
3. Ware ML, Berger MS, Binder DK: Molecular biology of glioma tumorigenesis. *Histol Histopathol* 2003, 18(1):207-216.
4. Ohgaki H: Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology* 2005, 25(1):1-7.
5. Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP: Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol* 2004, 70(2):137-160.
6. Harris SL, Levine AJ: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005, 24(17):2899-2908.
7. Nevins JR: The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* 2001, 10(7):699-703.
8. Ohgaki H, Kleihues P: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007, 170(5):1445-1453.
9. Ohgaki H, Kleihues P: Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, 64(6):479-489.
10. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al.: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005, 352(10):987-996.
11. Pulkkanen KJ, Yla-Herttuala S: Gene therapy for malignant glioma: current clinical status. *Mol Ther* 2005, 12(4):585-598.
12. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988, 332(6163):411-415.
13. Kedzierski RM, Yanagisawa M: Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001, 41:851-876.
14. Levin ER: Endothelins. *N Engl J Med* 1995, 333(6):356-363.
15. Lee ME, de la Monte SM, Ng SC, Bloch KD, Quertermous T: Expression of the potent vasoconstrictor endothelin in the human central nervous system. *J Clin Invest* 1990, 86(1):141-147.
16. Takahashi K, Ghatei MA, Jones PM et al.: Endothelin in human brain and pituitary gland: presence of immunoreactive endothelin, endothelin messenger ribonucleic acid, and endothelin receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, 72(3):693-699.

17. MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH: Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, 87(6):2359-2363.
18. Goldie RG: Endothelins in health and disease: an overview. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999, 26(2):145-148.
19. Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA et al.: Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice. *Cell* 1994, 79(7):1267-1276.
20. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A et al.: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994, 79(7):1277-1285.
21. Clouthier DE, Hosoda K, Richardson JA et al.: Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 1998, 125(5):813-824.
22. Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H et al.: Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Dev Biol* 2000, 217(1):10-24.
23. Kurihara Y, Kurihara H, Suzuki H et al.: Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* 1994, 368(6473):703-710.
24. Kurihara Y, Kurihara H, Oda H et al.: Aortic arch malformations and ventricular septal defect in mice deficient in endothelin-1. *J Clin Invest* 1995, 96(1):293-300.
25. Yanagisawa H, Yanagisawa M, Kapur RP et al.: Dual genetic pathways of endothelin-mediated intercellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene. *Development* 1998, 125(5):825-836.
26. Yanagisawa H, Hammer RE, Richardson JA et al.: Disruption of ECE-1 and ECE-2 reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest* 2000, 105(10):1373-1382.
27. Grant K, Loizidou M, Taylor I: Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer* 2003, 88(2):163-166.
28. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P: The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(2):110-116.
29. Bagnato A, Natali PG: Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med* 2004, 2(1):16.
30. Kusuvara M, Yamaguchi K, Nagasaki K et al.: Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1990, 50(11):3257-3261.
31. Ali H, Dashwood M, Dawas K, Loizidou M, Savage F, Taylor I: Endothelin receptor expression in colorectal cancer. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 36(5 Suppl 1):S69-71.

32. Shichiri M, Hirata Y, Marumo F: Endothelin-1 as an autocrine/paracrine factor for human tumor cell lines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991, 17 Suppl 7:S76-78.
33. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D, Catt KJ: Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1995, 1(9):1059-1066.
34. Nakamuta M, Ohashi M, Tabata S et al.: High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1993, 88(2):248-252.
35. Nelson JB, Hedican SP, George DJ et al.: Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med* 1995, 1(9):944-949.
36. Shankar A, Loizidou M, Aliev G et al.: Raised endothelin 1 levels in patients with colorectal liver metastases. *Br J Surg* 1998, 85(4):502-506.
37. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP et al.: Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* 1996, 56(4):663-668.
38. Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F: Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am J Pathol* 2000, 157(6):1863-1874.
39. Bagnato A, Salani D, Di Castro V et al.: Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res* 1999, 59(3):720-727.
40. Yamashita J, Ogawa M, Inada K, Yamashita S, Matsuo S, Takano S: A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991, 74(3):363-369.
41. Wulfing P, Diallo R, Kersting C et al.: Expression of endothelin-1, endothelin-A, and endothelin-B receptor in human breast cancer and correlation with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* 2003, 9(11):4125-4131.
42. Suzuki T, Hoshi N, Watanabe K, Kasukawa R, Suzuki T: Immunohistochemical localization of endothelin-1/big endothelin-1 in normal liver, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Fukushima J Med Sci* 1998, 44(2):93-105.
43. Harland SP, Kuc RE, Pickard JD, Davenport AP: Characterization of endothelin receptors in human brain cortex, gliomas, and meningiomas. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, 26 Suppl 3:S408-411.
44. Pagotto U, Arzberger T, Hopfner U, Weindl A, Stalla GK: Cellular localization of endothelin receptor mRNAs (ETA and ETB) in brain tumors and normal human brain. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995, 26 Suppl 3:S104-106.
45. Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R, Raidoo DM: Cellular distribution of the endothelin system in the human brain. *J Chem Neuroanat* 2004, 27(2):87-98.

46. Egidy G, Eberl LP, Valdenaire O et al.: The endothelin system in human glioblastoma. *Lab Invest* 2000, 80(11):1681-1689.
47. Sone M, Takahashi K, Totsune K et al.: Expression of endothelin-1 and endothelin receptors in cultured human glioblastoma cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 36(5 Suppl 1):S390-392.
48. Harland SP, Kuc RE, Pickard JD, Davenport AP: Expression of endothelin(A) receptors in human gliomas and meningiomas, with high affinity for the selective antagonist PD156707. *Neurosurgery* 1998, 43(4):890-898; discussion 898-899.
49. Pagotto U, Arzberger T, Hopfner U et al.: Expression and localization of endothelin-1 and endothelin receptors in human meningiomas. Evidence for a role in tumoral growth. *J Clin Invest* 1995, 96(4):2017-2025.
50. Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL et al.: Correlation of endothelin-1 and transforming growth factor beta 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997, 56(4):435-439.
51. Naidoo V, Naidoo S, Mahabeer R, Raidoo DM: Localization of the endothelin system in human diffuse astrocytomas. *Cancer* 2005, 104(5):1049-1057.
52. Vacca F, Bagnato A, Catt KJ, Tecce R: Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 2000, 60(18):5310-5317.
53. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A: Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 1996, 379(6565):557-560.
54. Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P: Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 1993, 14(2):385-399.
55. Bagnato A, Rosano L, Di Castro V et al.: Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am J Pathol* 2001, 158(3):841-847.
56. Kitagawa N, Tsutsumi K, Niwa M et al.: A selective endothelin ETA antagonist, BQ-123, inhibits ¹²⁵I-endothelin-1 (¹²⁵I-ET-1) binding to human meningiomas and antagonizes ET-1-induced proliferation of meningioma cells. *Cell Mol Neurobiol* 1994, 14(2):105-118.
57. Asano T, Aoyagi M, Hirakawa K, Ikawa Y: Effect of endothelin-1 as growth factor on a human glioma cell line; its characteristic promotion of DNA synthesis. *J Neurooncol* 1994, 18(1):1-7.
58. Sasaki Y, Hori S, Oda K, Okada T, Takimoto M: Both ET(A) and ET(B) receptors are involved in mitogen-activated protein kinase activation and DNA synthesis of astrocytes: study using ET(B) receptor-deficient rats (aganglionosis rats). *Eur J Neurosci* 1998, 10(9):2984-2993.

59. Supattapone S, Simpson AW, Ashley CC: Free calcium rise and mitogenesis in glial cells caused by endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 165(3):1115-1122.
60. Lazarini F, Strosberg AD, Couraud PO, Cazaubon SM: Coupling of ETB endothelin receptor to mitogen-activated protein kinase stimulation and DNA synthesis in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* 1996, 66(2):459-465.
61. Nelson JB, Udan MS, Guruli G, Pflug BR: Endothelin-1 inhibits apoptosis in prostate cancer. *Neoplasia* 2005, 7(7):631-637.
62. Wu-Wong JR, Chiou WJ, Dickinson R, Opgenorth TJ: Endothelin attenuates apoptosis in human smooth muscle cells. *Biochem J* 1997, 328 (Pt 3):733-737.
63. Shichiri M, Marumo F, Hirata Y: Endothelin-B receptor-mediated suppression of endothelial apoptosis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998, 31 Suppl 1:S138-141.
64. Eberl LP, Valdenaire O, Saintgiorgio V, Jeannin JF, Juillerat-Jeanneret L: Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000, 86(2):182-187.
65. Vigne P, Marsault R, Breitmayer JP, Frelin C: Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem J* 1990, 266(2):415-420.
66. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y: Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1988, 238(2):249-252.
67. Bek EL, McMillen MA: Endothelins are angiogenic. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000, 36(5 Suppl 1):S135-139.
68. Salani D, Taraboletti G, Rosano L et al.: Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 2000, 157(5):1703-1711.
69. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR et al.: Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2000, 157(5):1537-1547.
70. Wulfing P, Kersting C, Tio J et al.: Endothelin-1-, endothelin-A-, and endothelin-B-receptor expression is correlated with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(7):2393-2400.
71. Ahn K, Beningo K, Olds G, Hupe D: The endothelin-converting enzyme from human umbilical vein is a membrane-bound metalloprotease similar to that from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(18):8606-8610.
72. Takahashi M, Matsushita Y, Iijima Y, Tanzawa K: Purification and characterization of endothelin-converting enzyme from rat lung. *J Biol Chem* 1993, 268(28):21394-21398.

73. Ohnaka K, Takayanagi R, Nishikawa M, Haji M, Nawata H: Purification and characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in porcine aortic endothelium. *OFF. J Biol Chem* 1993, 268(35):26759-26766.
74. Barnes K, Walkden BJ, Wilkinson TC, Turner AJ: Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localization in rat hippocampus. *J Neurochem* 1997, 68(2):570-577.
75. Emoto N, Yanagisawa M: Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 1995, 270(25):15262-15268.
76. Turner AJ, Isaac RE, Coates D: The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays* 2001, 23(3):261-269.
77. Kashiwabara T, Inagaki Y, Ohta H et al.: Putative precursors of endothelin have less vasoconstrictor activity in vitro but a potent pressor effect in vivo. *FEBS Lett* 1989, 247(1):73-76.
78. Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T et al.: 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* 1989, 13 Suppl 5:S5-7; discussion S18.
79. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB: Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *J Biol Chem* 2001, 276(27):24540-24548.
80. Johnson GD, Stevenson T, Ahn K: Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin. *J Biol Chem* 1999, 274(7):4053-4058.
81. Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H et al.: Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells. *J Mol Med* 1997, 75(7):512-521.
82. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G et al.: A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 1999, 264(2):341-349.
83. Funke-Kaiser H, Bolbrinker J, Theis S et al.: Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1). *FEBS Lett* 2000, 466(2-3):310-316.
84. Orzechowski HD, Richter CM, Funke-Kaiser H, Lemmer J, Theis S, Paul M: Cloning and functional characterization of the bovine endothelin-converting enzyme-1a promoter. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1446(3):352-358.
85. Funke-Kaiser H, Orzechowski HD, Richter M, Paul M: Human endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA expression is regulated by an alternative promoter. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998, 31 Suppl 1:S7-9.

86. Schmidt M, Kroger B, Jacob E et al.: Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1). *FEBS Lett* 1994, 356(2-3):238-243.
87. Shimada K, Matsushita Y, Wakabayashi K et al.: Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 207(2):807-812.
88. Shimada K, Takahashi M, Ikeda M, Tanzawa K: Identification and characterization of two isoforms of an endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett* 1995, 371(2):140-144.
89. Valdenaire O, Rohrbacher E, Mattei MG: Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J Biol Chem* 1995, 270(50):29794-29798.
90. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P et al.: Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 1997, 328 (Pt 3):871-877.
91. Valdenaire O, Barret A, Schweizer A et al.: Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *J Cell Sci* 1999, 112 Pt 18:3115-3125.
92. Funke-Kaiser H, Thomas A, Bremer J et al.: Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites. *J Hypertens* 2003, 21(11):2111-2124.
93. Funalot B, Courbon D, Brousseau T et al.: Genes encoding endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: the EVA study. *J Hypertens* 2004, 22(4):739-743.
94. Funke-Kaiser H, Reichenberger F, Kopke K et al.: Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure regulation. *Hum Mol Genet* 2003, 12(4):423-433.
95. Trimarchi JM, Lees JA: Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3(1):11-20.
96. Dimova DK, Dyson NJ: The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* 2005, 24(17):2810-2826.
97. Dyson N: The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998, 12(15):2245-2262.
98. Helin K: Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 1998, 8(1):28-35.
99. Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR: Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 1993, 365(6444):349-352.

100. DeGregori J, Leone G, Ohtani K, Miron A, Nevins JR: E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev* 1995, 9(23):2873-2887.
101. Miyajima M, Nornes HO, Sato K, Neuman T: Overexpression of E2F1 in astrocytes leads to neoplastic transformation and changes in expression of retinoblastoma family members. *J Neurosci Res* 1996, 46(1):108-113.
102. Muller H, Bracken AP, Vernell R et al.: E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 2001, 15(3):267-285.
103. Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D: E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 2002, 21(3):437-446.
104. He Y, Armanious MK, Thomas MJ, Cress WD: Identification of E2F-3B, an alternative form of E2F-3 lacking a conserved N-terminal region. *Oncogene* 2000, 19(30):3422-3433.
105. Leone G, Nuckolls F, Ishida S et al.: Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol* 2000, 20(10):3626-3632.
106. Frolov MV, Dyson NJ: Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 11):2173-2181.
107. Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB et al.: E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* 2002, 16(8):933-947.
108. Logan N, Delavaine L, Graham A et al.: E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* 2004, 23(30):5138-5150.
109. Logan N, Graham A, Zhao X et al.: E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* 2005, 24(31):5000-5004.
110. Maiti B, Li J, de Bruin A et al.: Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem* 2005, 280(18):18211-18220.
111. Patient RK, McGhee JD: The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* 2002, 12(4):416-422.
112. Burch JB: Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol* 2005, 16(1):71-81.
113. Shimizu R, Yamamoto M: Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol* 2005, 16(1):129-136.

114. Tsai FY, Keller G, Kuo FC et al.: An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 1994, 371(6494):221-226.
115. Zhou Y, Yamamoto M, Engel JD: GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development* 2000, 127(17):3829-3838.
116. Nardelli J, Thiesson D, Fujiwara Y, Tsai FY, Orkin SH: Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* 1999, 210(2):305-321.
117. Kornhauser JM, Leonard MW, Yamamoto M, LaVail JH, Mayo KE, Engel JD: Temporal and spatial changes in GATA transcription factor expression are coincident with development of the chicken optic tectum. *Brain Res Mol Brain Res* 1994, 23(1-2):100-110.
118. Herberth B, Minko K, Csillag A, Jaffredo T, Madarasz E: SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* 2005, 23(5):449-463.
119. Pandolfi PP, Roth ME, Karis A et al.: Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet* 1995, 11(1):40-44.
120. Lee ME, Temizer DH, Clifford JA, Quertermous T: Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 1991, 266(24):16188-16192.
121. Morimoto T, Hasegawa K, Kaburagi S et al.: Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000, 275(18):13721-13726.
122. Mantovani R: A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res* 1998, 26(5):1135-1143.
123. Mantovani R: The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 1999, 239(1):15-27.
124. Bolognese F, Wasner M, Dohna CL et al.: The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated. *Oncogene* 1999, 18(10):1845-1853.
125. Caretti G, Salsi V, Vecchi C, Imbriano C, Mantovani R: Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem* 2003, 278(33):30435-30440.
126. Sinha S, Maity SN, Lu J, de Crombrughe B: Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92(5):1624-1628.
127. Romier C, Cocchiarella F, Mantovani R, Moras D: The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* 2003, 278(2):1336-1345.

128. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193(1):265-275.
129. Muller L, Barret A, Etienne E et al.: Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J Biol Chem* 2003, 278(1):545-555.
130. Higuchi R, Krummel B, Saiki RK: A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 1988, 16(15):7351-7367.
131. Bolbrinker J: Promotorklonierung des humanen Endothelin-Konvertierungsenzyms (ECE)-1c und Identifizierung regulatorischer Promotorelemente. Dissertation, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin 2004.
132. Cartharius K, Frech K, Grote K et al.: MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005, 21(13):2933-2942.
133. Heinemeyer T, Chen X, Karas H et al.: Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res* 1999, 27(1):318-322.
134. Ehrenreich H, Loffler BM, Hasselblatt M et al.: Endothelin converting enzyme activity in primary rat astrocytes is modulated by endothelin B receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 261(1):149-155.
135. Funalot B, Ouimet T, Claperon A et al.: Endothelin-converting enzyme-1 is expressed in human cerebral cortex and protects against Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2004, 9(12):1122-1128, 1059.
136. Fry CJ, Farnham PJ: Context-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1999, 274(42):29583-29586.
137. Bryant GO, Ptashne M: Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell* 2003, 11(5):1301-1309.
138. Orlando V, Paro R: Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 1993, 75(6):1187-1198.
139. DeGregori J: The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1602(2):131-150.
140. Weis L, Reinberg D: Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *Faseb J* 1992, 6(14):3300-3309.
141. Tao Y, Kassatly RF, Cress WD, Horowitz JM: Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *Mol Cell Biol* 1997, 17(12):6994-7007.
142. Cress WD, Nevins JR: A role for a bent DNA structure in E2F-mediated transcription activation. *Mol Cell Biol* 1996, 16(5):2119-2127.

143. Sears R, Ohtani K, Nevins JR: Identification of positively and negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol Cell Biol* 1997, 17(9):5227-5235.
144. Advani SJ, Weichselbaum RR, Roizman B: E2F proteins are posttranslationally modified concomitantly with a reduction in nuclear binding activity in cells infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* 2000, 74(17):7842-7850.
145. Kusek JC, Greene RM, Pisano MM: Expression of the E2F and retinoblastoma families of proteins during neural differentiation. *Brain Res Bull* 2001, 54(2):187-198.
146. Kusek JC, Greene RM, Nugent P, Pisano MM: Expression of the E2F family of transcription factors during murine development. *Int J Dev Biol* 2000, 44(3):267-277.
147. Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon JP, Lees JA: E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* 1997, 17(12):7268-7282.
148. Jordan-Sciutto KL, Wang G, Murphy-Corb M, Wiley CA: Induction of cell-cycle regulators in simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am J Pathol* 2000, 157(2):497-507.
149. Dirks PB, Rutka JT, Hubbard SL, Mondal S, Hamel PA: The E2F-family proteins induce distinct cell cycle regulatory factors in p16-arrested, U343 astrocytoma cells. *Oncogene* 1998, 17(7):867-876.
150. Jordan-Sciutto KL, Malaiyandi LM, Bowser R: Altered distribution of cell cycle transcriptional regulators during Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, 61(4):358-367.
151. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD: Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol* 1999, 11(3):162-167.
152. Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP: Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 1996, 13(5):1065-1072.
153. van Ginkel PR, Hsiao KM, Schjerven H, Farnham PJ: E2F-mediated growth regulation requires transcription factor cooperation. *J Biol Chem* 1997, 272(29):18367-18374.
154. Ubeda M, Habener JF: CHOP gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires NFY interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. *Nucleic Acids Res* 2000, 28(24):4987-4997.
155. Faniello MC, Bevilacqua MA, Condorelli G et al.: The B subunit of the CAAT-binding factor NFY binds the central segment of the Co-activator p300. *J Biol Chem* 1999, 274(12):7623-7626.

156. Bellorini M, Zemzoumi K, Farina A, Berthelsen J, Piaggio G, Mantovani R: Cloning and expression of human NF-YC. *Gene* 1997, 193(1):119-125.
157. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK et al.: Overexpression of E2F-1 in glioma triggers apoptosis and suppresses tumor growth in vitro and in vivo. *Nat Med* 1998, 4(6):685-690.
158. Iwase S, Furukawa Y, Kikuchi J et al.: Modulation of E2F activity is linked to interferon-induced growth suppression of hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1997, 272(19):12406-12414.
159. Yang XH, Sladek TL: Novel phosphorylated forms of E2F-1 transcription factor bind to the retinoblastoma protein in cells overexpressing an E2F-1 cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 232(2):336-339.
160. Chen WD, Otterson GA, Lipkowitz S, Khleif SN, Coxon AB, Kaye FJ: Apoptosis is associated with cleavage of a 5 kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. *Oncogene* 1997, 14(10):1243-1248.
161. Hou ST, Cowan E, Walker T et al.: The transcription factor E2F1 promotes dopamine-evoked neuronal apoptosis by a mechanism independent of transcriptional activation. *J Neurochem* 2001, 78(2):287-297.
162. Suzuki T, Yasui W, Yokozaki H, Naka K, Ishikawa T, Tahara E: Expression of the E2F family in human gastrointestinal carcinomas. *Int J Cancer* 1999, 81(4):535-538.
163. Motonaga K, Itoh M, Hirayama A et al.: Up-regulation of E2F-1 in Down's syndrome brain exhibiting neuropathological features of Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 2001, 905(1-2):250-253.
164. Dynlacht BD, Flores O, Lees JA, Harlow E: Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* 1994, 8(15):1772-1786.
165. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnicka-Worms H: Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1994, 14(12):8420-8431.
166. Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I et al.: Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* 1995, 10(2):229-236.
167. Vandel L, Kouzarides T: Residues phosphorylated by TFIIH are required for E2F-1 degradation during S-phase. *Embo J* 1999, 18(15):4280-4291.
168. Lin WC, Lin FT, Nevins JR: Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* 2001, 15(14):1833-1844.
169. Stevens C, Smith L, La Thangue NB: Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2003, 5(5):401-409.

170. Fagan R, Flint KJ, Jones N: Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell* 1994, 78(5):799-811.
171. Peeper DS, Keblusek P, Helin K, Toebes M, van der Eb AJ, Zantema A: Phosphorylation of a specific cdk site in E2F-1 affects its electrophoretic mobility and promotes pRB-binding in vitro. *Oncogene* 1995, 10(1):39-48.
172. Feber A, Clark J, Goodwin G et al.: Amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene* 2004, 23(8):1627-1630.
173. Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P et al.: E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. *Oncogene* 2004, 23(33):5616-5623.
174. Foster CS, Falconer A, Dodson AR et al.: Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome. *Oncogene* 2004, 23(35):5871-5879.
175. Ziebold U, Lee EY, Bronson RT, Lees JA: E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Biol* 2003, 23(18):6542-6552.
176. Walczak JR, Pili R, Carducci MA: Novel and emerging treatment techniques in prostate cancer. In: *UpToDate*, Rose, BD (Ed), UpToDate, Wellesley, MA, 2005.
177. Berger Y, Dehmlow H, Blum-Kaelin D et al.: Endothelin-converting enzyme-1 inhibition and growth of human glioblastoma cells. *J Med Chem* 2005, 48(2):483-498.
178. Kawamoto T, Ohira M, Hamano S, Hori T, Nakagawara A: High expression of the novel endothelin-converting enzyme genes, Nbla03145/ECEL1alpha and beta, is associated with favorable prognosis in human neuroblastomas. *Int J Oncol* 2003, 22(4):815-822.
179. Zhu JW, Field SJ, Gore L et al.: E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2001, 21(24):8547-8564.

Erklärung

Ich, Juliane Bremer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression und Funktion Endothelin-Konvertierungsenzym-1 regulierender Transkriptionsfaktoren in humanen neuroepithelialen und meningealen Tumoren“ 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: 26.11.2008