

Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Martin Paul

**Promotorklonierung des humanen Endothelin-Konvertierungsenzyms (ECE)-1c
und Identifizierung regulatorischer Promotorelemente**

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

vorgelegt von: Juliane Bolbrinker
aus: Bielefeld

Referent: Privatdozent Dr. Hans-Dieter Orzechowski

Korreferent: Professor Dr. Detlev Ganten

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 03.09.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1 DANKSAGUNG	1
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	2
3 EINLEITUNG	7
3.1 Das Endothelinsystem	7
3.1.1 Identifizierung der Endotheline	7
3.1.2 Synthese, Expression und Abbau der Endotheline	7
3.1.3 Die Endothelinrezeptoren	9
3.1.4 Biologische Bedeutung der Endotheline	11
3.2 Die Endothelin-Konvertierungsenzyme	13
3.2.1 Identifizierung und Genstruktur	13
3.2.2 Biochemische Struktur und Enzymkinetik	15
3.2.3 Gewebeexpression	17
3.2.4 Bedeutung der Endothelin-Konvertierungsenzyme	19
3.3 Prinzipien der isoformspezifischen Genexpression	21
3.3.1 Allgemeine Grundsätze	21
3.3.2 Isoformspezifische Genregulation des ECE-1	24
4 FRAGESTELLUNG	26
5 MATERIAL UND METHODEN	28
5.1 Materialliste und Bezugsquellen	28
5.1.1 Chemikalien	28
5.1.2 Lösungen, Puffer, Medien, Gele	30
5.1.3 Enzyme	31
5.1.4 Vektoren	31
5.1.5 Kits	32
5.1.6 Zellkulturbedarf	32
5.1.7 Zellkulturmedien	33
5.1.8 Geräte	34
5.2 Molekularbiologische Untersuchungen	34
5.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA	34
5.2.2 Synthese von cDNA durch reverse Transkription	35
5.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
5.2.4 Genomische PCR	36
5.2.5 Subklonierung in den pGL3basic-Luziferase-Reportervektor	38
5.2.6 Herstellung der Reportergergenkonstrukte	40
5.2.7 Weitere Reportergergenkonstrukte	41
5.2.8 Punktmutation in der E2F-Konsensussequenz des ECE-1c Promotors	41
5.2.9 RNase Protection Assay (RPA)	43
5.2.10 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	44
5.2.11 Primerdesign und -synthese	46

5.3 Zellkultur	48
5.3.1 Primärkultur	48
5.3.2 Zelllinien	49
5.3.3 Passagieren von Zellen	49
5.3.4 Transfektion	50
5.3.5 Zellernte	52
5.3.6 Bestimmung der Luziferaseaktivität	53
5.3.7 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	53
5.3.8 Statistik	53
6 ERGEBNISSE	54
6.1 Klonierung des humanen ECE-1c Promotors	54
6.2 Promotoranalyse	56
6.2.1 Bioinformatische Promotoranalyse	56
6.2.2 Funktionelle Promotoranalyse	58
6.2.3 Promotoraktivität und Konsensussequenzen	62
6.2.4 Funktion der E2F-Konsensussequenz	66
6.2.5 Vergleich der isoformspezifischen Promotoraktivitäten	67
6.3 Bestimmung der isoformspezifischen ECE-1 mRNA-Spiegel	69
6.4 Analyse der Transkriptionsstartpunkte	70
7 DISKUSSION	72
7.1 Charakterisierung des ECE-1c Promotors	72
7.1.1 Strukturelle Merkmale in Bezug auf die Transkriptionsinitiation	72
7.1.2 Räumliche Assoziation von Transkriptionsstartpunkten mit strukturellen Promotorelementen	73
7.1.3 Regulatorische Komponenten des Promotors	76
7.2 Korrelation der Promotoraktivität mit den mRNA-Spiegeln	81
7.2.1 Methodische Grenzen	82
7.3 Bedeutung der Expression von ECE-1 Isoformen für die subzelluläre Lokalisation	84
7.4 Therapeutische Implikationen	87
8 ZUSAMMENFASSUNG	90
9 LITERATURVERZEICHNIS	92
10 VERÖFFENTLICHUNGEN	110
11 LEBENS LAUF	112

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Biosynthese der Endotheline am Beispiel von ET-1	8
Abb. 2:	5' genomische Organisation des humanen ECE-1 Gens und mRNA der ECE-1 Isoformen	14
Abb. 3:	Prinzip der DNA-Amplifikation mittels Ankerprimern	37
Abb. 4:	Prinzip der Subklonierung eines PCR-Fragmentes in einen Vektor und anschließende Transformation in DH5 α E. coli	38
Abb. 5:	ECE-1c Promotor: Reporter-genkonstrukte	41
Abb. 6:	Einfügen von Punktmutationen mittels PCR-Technik	42
Abb. 7:	RT-PCR mit cDNA aus HUVEC zur Bestätigung der genomischen Sequenz als 5'-UTR des ECE-1c Gens	54
Abb. 8:	Genomische Sequenz der 5'-UTR von ECE-1c	56
Abb. 9:	Promotoraktivität des ECE-1c Reporter-genvollkonstruktes -968	59
Abb. 10:	Promotoraktivität serieller Deletionsmutanten des ECE-1c Vollkonstruktes (-968) in BAEC	60
Abb. 11:	Promotoraktivität serieller Deletionsmutanten des ECE-1c Vollkonstruktes (-968) in ECV304	60
Abb. 12:	Promotoraktivität der Deletionsmutanten -142, -240 und -490 in MCF7-Zellen	63
Abb. 13:	Promotoraktivitäten nach transienter Transfektion von MCF7 mit den ECE-1c Reporter-genkonstrukten -142, -217 und -240	64
Abb. 14:	Promotoraktivitäten nach transienter Transfektion von ECV304 mit den ECE-1c Reporter-genkonstrukten -142, -217 und -240	64
Abb. 15:	Promotoraktivitäten nach Transfektion von MCF7 mit den Reporter-genkonstrukten -142, -409 und -490	65
Abb. 16:	Zellspezifische Aktivität des ECE-1c Promotors nach Transfektion des Konstrukts -739	66
Abb. 17:	Promotoraktivität nach Transfektion von MCF7 mit den	67

	Konstrukten –142, –490 (Wildtyp) und –490 (punktmutiert)	
Abb. 18:	Promotoraktivität nach Transfektion von ECV304 mit den Konstrukten –142, –490 (Wildtyp) und –490 (punktmutiert)	67
Abb. 19:	Tie-1 und ECE-1 isoformspezifische Promotoraktivität in MCF7	68
Abb. 20:	Tie-1 und ECE-1 isoformspezifische Promotoraktivität in ECV304	68
Abb. 21:	Isoformspezifische ECE-1 mRNA-Spiegel in MCF7- und ECV304-Zellen	69
Abb. 22:	Analyse der Transkriptionsstartpunkte mittels RPA	70
Abb. 23:	Analyse der Transkriptionsstartpunkte in HUVEC mittels 5'-RACE	71
Abb. 24:	Schematische Darstellung des humanen ECE-1c Promotors	81

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Substratspezifität von ECE-1	16
Tab. 2:	Verwendete Primer	47
Tab. 3:	Mögliche regulatorische Elemente im humanen ECE-1c Promotor	57
Tab. 4:	RLA und Signifikanzniveaus bei wiederholter Transfektion der Konstrukte –240, –490 und –739 in BAEC	61
Tab. 5:	N-terminale Aminosäuresequenzen der ECE-1 Isoformen	86

PROTOKOLLVERZEICHNIS

Protokoll 1:	DNase-Dau	35
Protokoll 2:	Reverse Transkription	35
Protokoll 3:	RT-PCR	36
Protokoll 4:	Genomische PCR	37
Protokoll 5:	Dau der aufgereinigten DNA	39
Protokoll 6:	Dau des pGL3basic-Plasmids	39

Protokoll 7:	Ligation	40
Protokoll 8:	Nachdau	40
Protokoll 9:	Transformation	40
Protokoll 10/11:	Punktmutation im E2F-Element mittels PCR; Ansatz 1a und 1b	43
Protokoll 12:	Punktmutation im E2F-Element mittels PCR; Ansatz 2	43
Protokoll 13:	Einfügen des Poly-G-Ankers	45
Protokoll 14:	RACE mit Poly-C sense-Primer und antisense-Primer in Exon 2	45
Protokoll 15:	<i>Nested</i> PCR mit einem antisense-Primer in Exon 1c	46
Protokoll 16:	Transfektionslösung für BAEC	51
Protokoll 17:	Transfektionslösung für ECV304	51
Protokoll 18:	Transfektionslösung für MCF7	52
Protokoll 19:	Transfektionslösung für EA.hy926	52
Protokoll 20:	Transfektionslösung für MDA MB 435s	52

1 Danksagung

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

Herrn Privatdozent Dr. Hans-Dieter Orzechowski danke ich für die Überlassung des Themas und die gewissenhafte Betreuung dieser Promotion.

Herrn Dr. Heiko Funke-Kaiser gilt mein herzlicher und aufrichtiger Dank für seine stetige Unterstützung, die manchmal ermüdenden, aber immer fruchtbaren Diskussionen, die gemeinsam durchgearbeiteten Nächte und seine Tatkraft.

Bei Frau Christel Meißner und Frau Birgitta Schwaneberg möchte ich mich ganz herzlich für ihre vielfältige technische Hilfe und die unentbehrlichen Tipps bei dem Erlernen von Methoden und für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Allen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die ausgesprochen freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Aufmunterungen. Im besonderen seien die genannt, die zu Freunden geworden sind: Julia Lemmer, Marwan Manaa, Heike Marquardt, Robert Real, Claus-Michael Richter, Jacqueline Schönfelder, Steffen Theis, Frank Zollmann, Heiko Zürcher.

Meinen Freunden Frau Anne Letsch, Herrn Christian Lorenz und Herrn Gilbert Schönfelder möchte ich für ihre Geduld und ihre zuverlässige Hilfe bei der Korrektur und abschließenden Fertigstellung der Arbeit danken.

Meiner Mutter danke ich für ihre unentwegte Teilnahme, Motivation und Unterstützung sowohl im Verlauf dieser Arbeit als auch während meiner gesamten beruflichen Ausbildung.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte das c-spezifische Exon des humanen Gens für ECE-1 genomisch lokalisiert, die Startpunkte der Transkription von ECE-1c mRNA lokalisiert und der ECE-1c Promotor kloniert sowie funktionell charakterisiert werden. Das Exon ECE-1c liegt 55 kbp 5' des b-spezifischen Exons und ist damit das am weitesten 5' lokalisierte Exon des humanen ECE-1 Gens.

Der ECE-1c-spezifische Promotor enthält keine TATA-Box und kein Inr-Element, eine zusammen mit dem GC-Reichtum des Promotors typische Konstellation für einen *housekeeping*-Promotor. Durch das Fehlen eindeutiger Kernpromotorelemente verläuft die Transkriptionsinitiation bei TATA⁻Inr⁻-Promotoren häufig unpräzise. Auch im ECE-1c Promotor existieren multiple Transkriptionsstartpunkte, die mittels RPA an den Positionen -110, -140 und -350 bp relativ zum Translationsstartkodon in Exon 1c detektiert werden konnten, wobei die Subklonierung und anschließende Sequenzierung der RACE-Produkte eng benachbarte Startpunkte bei -101 und -106 bp bestätigte. Als mögliche *cis*-Elemente, die anstelle der TATA-Box und eines Inr die basale Transkription der ECE-1c mRNA initiieren und damit den Transkriptionsstart festlegen können, finden sich in dem Sequenzabschnitt zwischen -142 und -240 Konsensussequenzen für E2F (-154), Sp1 (-180) sowie zwei CAAT-Boxen (-196 und -220). Die Transfektionsexperimente in der vorliegenden Arbeit zeigten für diesen Promotorbereich den stärksten Anstieg in der RLA als Ausdruck der Promotoraktivität. Beide CAAT-Boxen im ECE-1c Promotor sind in passendem Abstand zu den ermittelten Transkriptionsstartpunkten bei etwa -110 und -140 lokalisiert. Die Konsensussequenz für E2F bei -154 bp vom Translationsstartkodon in Exon 1c liegt direkt 5' einer der detektierten Transkriptionsstartpunkte bei etwa -140 bp. Die durch Punktmutation dieses *cis*-Elementes nachgewiesene starke Reduktion der Promotoraktivität spricht für die zentrale Bedeutung von E2F bei der basalen Transkriptionsregulation von ECE-1c. Im ECE-1c Promotor liegen die Konsensussequenzen für die Bindung von Sp1 40 bp bzw. 70 bp 5' der Startpunkte bei -140 bzw. -110. GATA und ETS kommen als regulatorische

Transkriptionsfaktoren des ECE-1c Promotors in Betracht. In der distal gelegenen Promotorregion von ECE-1c finden sich zwei CA-Mikrosatelliten an den Positionen –507 bis –542 und –797 bis –836 sowie ein CG-Mikrosatellit zwischen –543 und –564, deren funktionell wirksame Polymorphismen später gezeigt werden konnten. Bedenkt man die Schlüsselrolle von ECE-1 im Rahmen der Endothelinbiosynthese, könnte diesem Promotorpolymorphismus eine pathophysiologische Bedeutung bei der Ausprägung kardiovaskulärer Erkrankungen zukommen.

Der ECE-1c Promotor zeigte im Vergleich zu den ECE-1a, -1b und -1d Promotoren eine deutlich stärkere Reporteraktivität, die sowohl zelltyp-, als auch speziesunabhängig nachgewiesen werden konnte. Die vorliegende Arbeit liefert somit erste Hinweise auf die transkriptionelle Regulation der am stärksten exprimierten ECE-1 Isoform, was zu einem besseren Verständnis der Regulation des Endothelinsystems während der Entwicklung und unter pathophysiologischen Bedingungen beitragen kann.

10 Veröffentlichungen

H. Funke-Kaiser, J. Bolbrinker, S. Theis, J. Lemmer, C.-M. Richter, M. Paul, H.-D. Orzechowski (2000)

Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1).

FEBS Letters, 466:310-316

H. Funke-Kaiser, A. Thomas, J. Bremer, S. D. Kovacevic, K. Scheuch, J. Bolbrinker, S. Theis, J. Lemmer, A. Zimmermann, F. S. Zollmann, S.-M. Herrmann, M. Paul und H.-D. Orzechowski (2003)

Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites.

J Hypertens, 21:2111-2124

Abstracts

H. Funke-Kaiser, J. Bolbrinker, S. Theis, J. Lemmer, C.-M. Richter, M. Paul, H.-D. Orzechowski (2000)

Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1).

J Mol Med, 78:P9

H. Funke-Kaiser, A. Thomas, J. Bolbrinker, J. Lemmer, C.-M. Richter, M. Paul, H.-D. Orzechowski (2001)

The human endothelin-converting enzyme-1c (ECE-1c)-promoter is highly polymorphic and regulated by NF-YB.

N-S Arch Pharmacol, 363(Suppl.S):26

J. Bolbrinker, M. Wehland, R. Kreutz (2002)

NAD(P)H-oxidase isoform Nox1 but not Nox4 is upregulated by angiotensin II in primary cultured rat mesangial cells.

Hypertension, 40:PA08

J. Bolbrinker, M. Wehland, R. Kreutz (2002)

NAD(P)H-oxidase isoform Nox1 but not Nox4 is a candidate for angiotensin II induced oxidative stress in mesangial cells.

Dtsch Med Wochenschr, 45(Suppl.1):S9

J. Bolbrinker, S. Markovic, P. Kossmehl, M. Wehland, R. Kreutz (2003)

Matrix metalloproteinase-9 expression in a rat model of angiotensin II-dependent nephropathy.

Hypertension, 42:644

J. Bolbrinker, S. Markovic, P. Kossmehl, M. Wehland, R. Kreutz (2003)

Matrix metalloproteinases and their regulators in a rat model of angiotensin II-dependent nephropathy.

Dtsch Med Wochenschr, 47(Suppl.3):S162

11 Lebenslauf

Name	Juliane Bolbrinker
Anschrift	Geisenheimer Str. 22 14197 Berlin Tel.: 030/ 897 456 39 Email: jbolbrinker@gmx.de
Geburtsdatum	30.05.1975
Geburtsort	Bielefeld
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Karl-Heinz Bolbrinker, verst. 1992 Ute-Juliane Bolbrinker, geb. Tente
Schulbildung	
August 1981 bis Juli 1985	Grundschule Rußheide, Bielefeld
August 1985 bis Juli 1994	Gymnasium Heepen, Bielefeld Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Hochschulausbildung	
WS 1994 - SS 1997	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
WS 1997	Wechsel an die Freie Universität Berlin zum 7. Fachsemester

Absolvierte Prüfungen

August 1996	Ärztliche Vorprüfung
August 1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Approbation	01. August 2003
-------------	-----------------

Wissenschaftliche

Mitarbeiterin	seit 01. August 2003 Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin
---------------	--

Berlin, den 10. Dezember 2003

Juliane Bolbrinker