

3 Einleitung

3.1 Das Endothelinsystem

3.1.1 Identifizierung der Endotheline

Nach der Entdeckung eines von Endothelzellen gebildeten vasokonstriktorisches Faktors durch Hickey et al. 1985 gelang es 1988 Yanagisawa et al., Endothelin-1 (ET-1) aus dem Mediumüberstand einer Endothelzellkultur vom Schwein zu isolieren. Ein Jahr später konnte die Arbeitsgruppe durch das Screening einer humanen genomischen DNA-Bank drei unabhängige Gene beschreiben, die jeweils für die Proteinvorläufer, die Präproendotheline (ppET-1, -2 und -3), kodieren (Inoue et al., 1989a). Die aktiven Formen dieser Isopeptide umfassen 21 Aminosäuren und zeigen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäureabfolge, wobei sich ET-2 und -3 durch den Austausch von zwei bzw. sechs Aminosäuren von ET-1 unterscheiden.

3.1.2 Synthese, Expression und Abbau der Endotheline

Dem verbreiteten biologischen Prinzip folgend, daß die aktive Form eines Proteins aus einem kaum wirksamen Vorläufer generiert wird, werden auch die Endotheline aus einem größeren Vorläuferprotein, dem Präproendothelin (ppET-1), durch proteolytische Spaltung gebildet. Dabei wird nach Translation der mRNA des ppET-1 in eine inaktive Proteinvorstufe mit 212 Aminosäuren (Inoue et al., 1989a/b) das Signalpeptid im Lumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums entfernt, und es entsteht das 198 Aminosäuren enthaltende Proendothelin-1 (Rubanyi und Polokoff, 1994; Webb, 1997). Dieses wird durch die in der Golgimembran lokalisierte Endopeptidase Furin zwischen Arg⁵² und Cys⁵³, sowie zwischen Arg⁹² und Ala⁹³ zu big Endothelin-1-Lys⁹¹-Arg⁹² gespalten (Denault et al., 1995). Furin spaltet dabei neben Proendothelin-1 noch eine Vielzahl anderer Vorläuferproteine, z. B. von Wachstumsfaktoren, Serumproteinen, Matrixmetalloproteinasen, Rezeptoren und bakteriellen Exotoxinen (Nakayama, 1997).

Eine Carboxypeptidase entfernt anschließend die beiden C-terminalen Aminosäuren Lysin und Arginin, und es entsteht big Endothelin-1 (big ET-1), das beim Menschen noch 38 Aminosäuren aufweist. Die Aktivierung zu ET-1 erfolgt durch das Endothelin-Konvertierungsenzym (ECE), indem big ET-1 zwischen Trp²¹ und Val²² in ET-1 und einen 19 Aminosäuren enthaltenden Rest gespalten wird (Xu et al., 1994). ET-1 ist dabei 140-fach stärker vasokonstriktorisch wirksam als big ET-1 (Kimura et al., 1989). Dem ECE kommt durch die Bildung des biologisch aktiven Proteins im letzten Schritt der Endothelinbiosynthese somit eine entscheidende Bedeutung zu: Es ist das Schlüsselenzym in der Bildung von ET-1 (**Abb. 1**). Ebenso werden die Peptide Endothelin-2 und -3 aus größeren Vorläuferproteinen generiert.

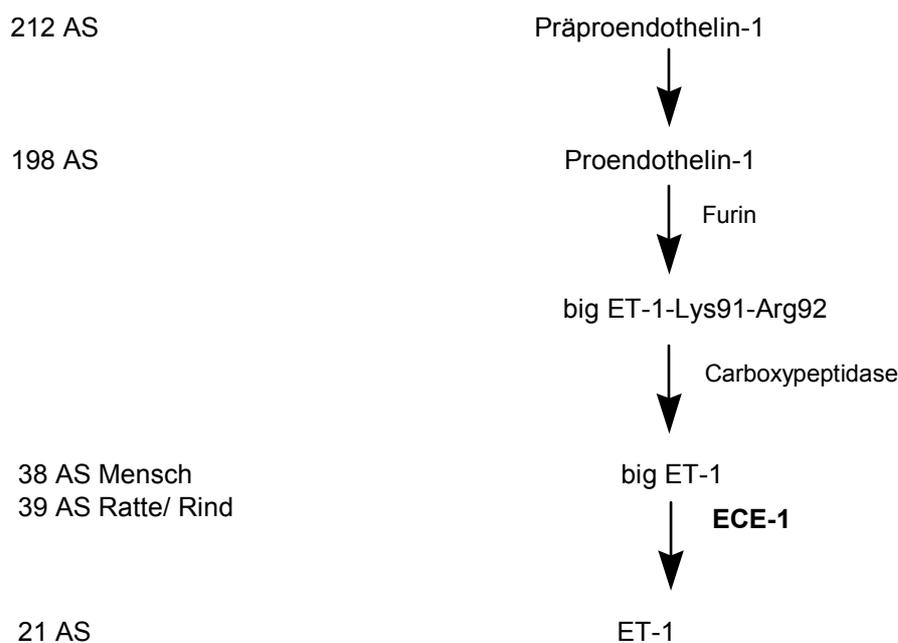


Abb. 1: Biosynthese der Endotheline am Beispiel von ET-1

Endothelin-1 zeigt ein breites Gewebeexpressionsmuster; u.a. wird es in Herz, Lunge, Niere, Leber, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Testis und ZNS nachgewiesen (Firth und Ratcliffe, 1992). Der zelltypspezifische Nachweis der ppET-1 mRNA u.a. in Endothelzellen, VSMC, Astrozyten, Neuronen, Kardiomyozyten, glomerulären Mesangialzellen, Bronchial- und Intestinalepithel sowie Makrophagen und Mastzellen unterstreicht das breite Verteilungsmuster von ET-1 (Rubanyi und Polokoff, 1994;

Kedzierski et al., 2001). Im Blutplasma konnte ET-1 lediglich in pikomolaren Konzentrationen nachgewiesen werden (Battistini et al., 1993), was zusammen mit der vorwiegend abluminalen Sekretion von ET-1 durch Endothelzellen eine auto- bzw. parakrine Wirkweise unter physiologischen Bedingungen nahelegt (Yoshimoto et al., 1991; Wagner et al., 1992; La und Reid, 1995). Abgebaut wird das zirkulierende Peptid zu über 50% in der ersten Lungenpassage zum einen durch die Neutrale Endopeptidase (NEP) (de Nucci et al., 1988; Abassi et al., 1992), zum anderen spielt die Bindung an den ET_B-Rezeptor mit anschließender Internalisierung eine wichtige Rolle (Fukuroda et al., 1994).

Endothelin-2 wird vor allem in Dünndarm und Colon nachgewiesen und findet sich in geringer Konzentration auch in Skelettmuskel, Herz und Magen (Davenport et al., 1991; Firth und Ratcliffe, 1992). Im Darm wird es von den Epithelzellen exprimiert (Kedzierski et al., 2001).

Endothelin-3 mRNA findet sich ebenso weit verbreitet wie ET-1, wobei die Expression in Dünndarm, Kolon, Lunge und Niere überwiegt (Firth und Ratcliffe, 1992; Rubanyi und Polokoff, 1994). Der zellspezifische Nachweis gelingt in neuronalen Zellen, renalen Tubuluszellen und Epithelzellen des Intestinums (Matsumoto et al., 1989).

3.1.3 Die Endothelinrezeptoren

Die Endotheline entfalten ihre Wirkung über die Endothelinrezeptor-Subtypen A (ET_A) und B (ET_B). 1990 wurden der ET_A-Rezeptor von Arai et al. beim Rind und der ET_B-Rezeptor von Sakurai et al. in der Ratte beschrieben. Die humane Sequenz der Rezeptorsubtypen konnte kurze Zeit später isoliert und charakterisiert werden (Hosoda et al., 1992; Arai et al., 1993). ET_A und ET_B gehören zu der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit einem extrazellulären Aminoterminal, einer transmembranären, heptahelikalen Domäne und einem intrazellulären Carboxylende (Ohlstein et al., 1996).

1993 wurde ein dritter Endothelinrezeptor (ET_C) aus *Xenopus laevis*, dem afrikanischen Krallenfrosch, kloniert (Karne et al., 1993). Dieser Rezeptor konnte beim Säugetier nicht identifiziert werden.

Der **ETA-Rezeptor** zeigt folgende absteigende Bindungsaffinität für die drei ET Isopeptide: ET-1 \geq ET-2 \gg ET-3 (Sakurai et al., 1992). ETA wird konstitutiv auf glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der großen und kleinen Blutgefäße exprimiert (Hori et al., 1992), aber auch auf den glatten Muskelzellen der Bronchien, auf Hepatozyten, Kardiomyozyten und Neuronen (Kedzierski et al., 2001). Die Bindung von Endothelin an ETA zieht über eine Stimulation von G_q-Proteinen die Aktivierung der Phospholipase C nach sich. Dadurch wird zum einen Inositoltriphosphat, zum anderen Diacylglycerol gebildet. Inositoltriphosphat bewirkt die Entleerung kalziumspeichernder Vesikel in das Zytoplasma, was letztlich zu einer Vasokonstriktion führt (Simonson und Dunn, 1990; Stryer, 1994). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und die Freisetzung von Diacylglycerol bewirken eine Aktivierung der Proteinkinase C, die für die mitogenen Effekte des Endothelins von Bedeutung sein könnte (Simonson und Herman, 1993).

Der Gefäß-**ET_B-Rezeptor** findet sich sowohl auf Endothelzellen als auch auf glatten Muskelzellen sowie unter anderem auf Hepatozyten, epithelialen Zellen des renalen Sammelrohres, Kardiomyozyten und Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems (Kedzierski et al., 2001). ET-1, -2 und -3 binden an den Rezeptor mit der gleichen Affinität. Die intrazellulären Effekte folgen zum einen dem ETA-vermittelten Signalweg, zum anderen ist in einigen Zelltypen der ET_B mit einem hemmenden G-Protein gekoppelt, was zu einer Inhibition der cAMP-Produktion und Aktivierung der Na⁺/H⁺-Ionenpumpe führt (Aramori und Nakanishi, 1992; Koh et al., 1992). Über den ET_B wird außerdem die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Synthese von EDRF/NO in Endothelzellen vermittelt, die zu der ET-vermittelten transienten Vasodilatation wesentlich beiträgt (Hirata et al., 1993; Haynes und Webb, 1994). Durch Bindung von ET-1 an den ET_B-Rezeptor und nachfolgender Internalisierung

von Protein und Rezeptor in die Zelle trägt ET_B zum Abbau von zirkulierendem ET-1 in Lunge und Niere bei (Fukuroda et al., 1994; Oksche et al., 2000).

3.1.4 Biologische Bedeutung der Endotheline

Die Endotheline galten bis zur Entdeckung von Urotensin-II (Ames et al., 1999) als die stärksten Vasokonstriktoren, die ihre Wirkung sowohl an großen Arterien und Venen, aber auch an Arteriolen entfalten (Yanagisawa et al., 1988; Hemsén et al., 1991). Dabei wird zunächst eine vorübergehende Gefäßdilataion induziert, die von einer lang anhaltenden Konstriktion abgelöst wird. Dies wird durch die Stimulation des endothelialen ET_B-Rezeptors mit nachfolgender Freisetzung von NO und Prostacyclin erklärt, bevor die ET_A-vermittelte Konstriktion an den VSMC wirksam wird (de Nucci et al., 1988; Emori et al., 1990; Filep et al., 1991; Hirata et al., 1993; Richard et al., 1995). Die intraarterielle Infusion von ET-1 in die Arteria brachialis gesunder Probanden resultierte in einer langsam zunehmenden Vasokonstriktion, die durch gleichzeitige Applikation von BQ-123, einem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten, verhindert werden konnte (Haynes und Webb, 1994).

Neben seiner Rolle bei der Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus kommt dem Endothelinsystem eine pathophysiologische Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen zu. So konnten 1991 Watanabe et al. durch Infusionen eines ET-1 Antikörpers das nekrotische Areal im Anschluß an einen Myokardinfarkt im Rattenmodell verkleinern. Ratten mit induzierter Herzinsuffizienz, die mit dem ET_A-Antagonisten BQ-123 behandelt wurden, zeigten eine 12-Wochen-Überlebensrate von 85%. Bei der Kontrollgruppe lag die Überlebensrate dagegen bei lediglich 43% (Sakai et al., 1996). In Patienten mit Herzinsuffizienz ist die Plasmakonzentration von ET-1 erhöht und korreliert mit der Schwere der Erkrankung (Wei et al., 1994). In der 1998 von Krum et al. veröffentlichten klinischen Studie bei Patienten mit essentieller Hypertonie konnte für den nichtselektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten Bosentan eine dem ACE-Hemmer Enalapril vergleichbare blutdrucksenkende Wirkung nachgewiesen werden.

Die pathophysiologische Bedeutung der Endotheline geht jedoch über die bei Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems hinaus. Zunehmend wird ihre Rolle bei der Endothelzellmigration und -proliferation, auch im Rahmen der Gefäßneubildung, sowie bei der Tumorgenese diskutiert. So konnten Morbidelli et al. 1995 eine Beteiligung von ET-1 bei der Proliferation und Migration kultivierter Endothelzellen über eine Aktivierung des ET_B-Rezeptors nachweisen, wobei NO eine permissive Rolle vor allem für die angiogenetischen Effekte der Endotheline zukommen soll (Noiri et al., 1997; Goligorsky et al., 1999). Die essentielle Bedeutung der Angiogenese für das Wachstum maligner Tumore ist seit der Erstbeschreibung durch Folkman et al. 1963 Gegenstand intensiver Forschung, und auch für ET-1 und -3 konnte ein starkes angiogenetisches Potential nachgewiesen werden (Salani et al., 2000; Cruz et al., 2001; Rosanò et al., 2003). Die Synthese von ET-1 in diversen humanen Karzinomzelllinien (Kusuhara et al., 1990), erhöhte Spiegel dieses Peptids im humanen Mammakarzinom (Yamashita et al., 1991), erhöhte ET-1 Plasmaspiegel bei Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom (Shankar et al., 1998), sowie die mitogene Wirkung von ET-1 auf Prostatakarzinom- und Gliomzellen (MacCumber et al., 1990; Nelson et al., 1995) verweisen auf eine mögliche Bedeutung des Endothelinsystems bei onkologischen Erkrankungen. Für astrozytäre Tumore konnte bereits eine Korrelation zwischen Malignitätsgrad und Expression von ET-1 gezeigt werden (Stiles et al., 1997). Weiterhin führte die Hemmung der ET-1 Synthese bei Prostatakarzinomzellen zu einer Verminderung des Tumorwachstums (Hsu und Pfahl, 1998). Erste Ergebnisse einer Phase I-Studie zeigten neben einer Reduktion des Knochenschmerzes einen Abfall der PSA-Spiegel innerhalb eines Monats bei den betroffenen Patienten (Kopetz et al., 2002). Bei Melanomzellen konnte über eine ET_B-Blockade das Zellwachstum inhibiert und Apoptose induziert werden (Lahav et al., 1999).

Endothelin und seine Rezeptoren sind des weiteren in die Pathophysiologie des akuten und chronischen Nierenversagens involviert. So führte die transgene Expression von ET-1 bei Mäusen ebenso wie die transgene Expression von ET-2 in Ratten zu Glomerulosklerose und konsekutiv zur progressiven Niereninsuffizienz (Hochoer et al., 1996; Hochoer et al., 1997). Bei der Ratte korrelierte darüber hinaus das Ausmaß des Nierenversagens mit den renalen ET-1 Spiegel (Orisio et al., 1993). Hier konnte die Applikation eines ET_A-Antagonisten die Proteinurie bei akuter und bei chronischer Niereninsuffizienz vermindern, die glomeruläre Filtrationsrate steigern und das Überleben der Tiere insgesamt verlängern (Benigni et al., 1993; Chan et al., 1994; Gellai et al., 1994; Hochoer et al., 2001).

Auf eine wichtige Rolle des Endothelinsystems bei der murinen Ontogenese verweisen Beobachtungen an sogenannten *knock out* Mäusen, d.h. an Tieren, bei denen einzelne Gene gezielt ausgeschaltet wurden. ET-1- und ET_A-defiziente Tiere zeigten kraniofaziale Fehlbildungen und Ventrikelseptumdefekte neben Fehlbildungen des kardialen Ausflußtraktes und der großen Gefäße (Kurihara et al., 1994 und 1995; Clouthier et al., 1998). ET-3 und ET_B *knock out* Mäuse wiesen eine Störung der Melanozytenmigration und eine dem Morbus Hirschsprung ähnliche Erkrankung auf (Baynash et al., 1994). Auch bei einigen Patienten mit Morbus Hirschsprung wurde eine Mutation von ET-3 oder des ET_B nachgewiesen (Puffenberger et al., 1994; Shanske et al., 2001).

3.2 Die Endothelin-Konvertierungsenzyme

3.2.1 Identifizierung und Genstruktur

Bereits bei der Erstbeschreibung von ET-1 wurde von Yanagisawa ein Endothelin-konvertierendes Enzym postuliert, welches von Waxman et al. 1994 aus der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 isoliert und enzymkinetisch untersucht werden konnte. Kurze Zeit später wurde die Klonierung von zwei humanen Endothelin-Konvertierungsenzymen (ECE) beschrieben: ECE-1 (Schmidt et al., 1994; Xu et al., 1994) und das homologe ECE-2 (Emoto und Yanagisawa, 1995).

Das Gen des humanen **ECE-1** besteht aus 21 Exonen, die sich über einen Bereich von mehr als 70 kbp erstrecken, und ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert (Valdenaire et al., 1995). Humanes ECE-1 wird in den vier Isoformen a (Shimada et al., 1995a), b (Schmidt et al., 1994), c (Schweizer et al., 1997) und d (Valdenaire et al., 1999a) exprimiert, die sich lediglich im N-Terminus unterscheiden, aber keine Unterschiede bezüglich Aktivität oder Substratspezifität aufweisen. Gemessen an der mRNA-Expression stellt die Isoform c dabei in den meisten untersuchten Geweben die Hauptisoform dar (Schweizer et al., 1997). Die uneinheitliche Nomenklatur in der Literatur bezüglich der einzelnen Isoformen begründet sich in den unterschiedlichen Bezeichnungen bei der Erstbeschreibung von zwei differierenden ECE-1 cDNAs 1995. Dabei publizierten fast zeitgleich zum einen Shimada et al. die Sequenzen für die Ratte und benannten sie ECE-1 α und -1 β , zum anderen wurden die humanen Isoformen von Valdenaire et al. als ECE-1a und ECE-1b bezeichnet (Shimada et al., 1995a/b; Valdenaire et al., 1995). ECE-1 β ist dabei identisch mit humanem ECE-1a. ECE-1 α der Ratte entspricht ECE-1c des Menschen (Schweizer et al., 1997; Turner et al., 1998; Valdenaire et al., 1999a). Über die genomische Organisation des humanen Gens für ECE-1 und die exprimierten Isoformen gibt **Abb. 2** Auskunft:

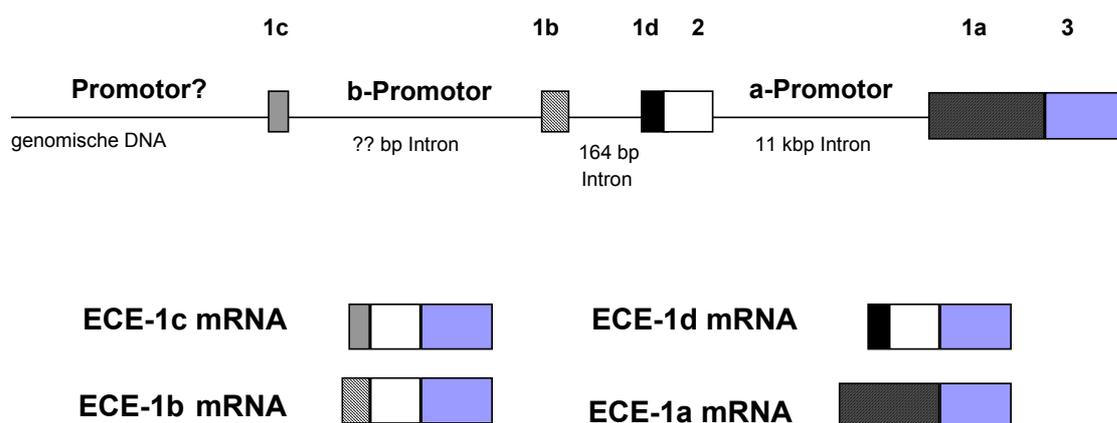


Abb. 2: 5' genomische Organisation des humanen ECE-1 Gens und mRNA der ECE-1 Isoformen

Die cDNA von **ECE-2** wurde zunächst für das Rind beschrieben (Emoto und Yanagisawa, 1995). Später konnten Lorenzo et al. (2001) cDNAs für humanes ECE-

2 klonieren und charakterisieren. Humanes ECE-2 wird in den Isoformen ECE-2A, -2B (Lorenzo et al., 2001) und -2C exprimiert (Mitteilung an GenBank durch Funke-Kaiser et al., 2002); für die bovine Spezies sind vier Subisoformen von ECE-2 (ECE-2a-1, ECE-2a-2, ECE-2b-1 und ECE-2b-2) beschrieben worden (Ikeda et al., 2002).

Ein weiteres ECE, bezeichnet als **ECE-3**, wurde aus der bovinen Iris extrahiert und ist bisher nur auf der Proteinebene charakterisiert worden (Hasegawa et al., 1998).

3.2.2 Biochemische Struktur und Enzymkinetik

ECE-1 ist eine membrangebundene, neutrale Zink-Metalloprotease, die zur Gruppe der Typ II Membranproteine gehört, deren N-Terminus im Zellzytoplasma lokalisiert ist (Schmidt et al., 1994; Xu et al., 1994; Turner und Murphy, 1996). Nur in diesem Bereich unterscheidet sich die Proteinstruktur der ECE-1 Isoformen, wohingegen sowohl die Transmembrandomäne als auch die extrazelluläre, C-terminale katalytische Domäne für alle identisch ist. Zwei ECE-Moleküle bilden über eine Disulfidbrücke an der Aminosäure Cystein⁴¹² ein Dimer aus, was durch die Abnahme des Molekulargewichtes von 250 kDa auf 120 kDa unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot bestätigt wird (Schmidt et al., 1994). Diese Dimerisation erhöht die Substratumsatzgeschwindigkeit (Shimada et al., 1996). Außerdem ist Glykosylierung für die Enzymaktivität essentiell (Nelboeck et al., 1998). Die von den humanen cDNAs abgeleiteten Peptidsequenzen weisen für ECE-1c 754, für ECE-1b 753 und für ECE-1a 758 Aminosäuren auf.

ECE-1 katalysiert hauptsächlich die proteolytische Spaltung von big ET-1 bei einem pH-Optimum von 7; mit geringerer Umsatzrate werden big ET-2 und -3 umgesetzt. Die relativen Konversionsraten in Abhängigkeit von der untersuchten Zell- bzw. Gewebeart sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

big ET-1 : big ET-2 : big ET-3	Zellart
4 : 1 : 2	aufgereinigtes Enzym aus der Rattenlunge; Takahashi et al., 1995
10 : 3,6 : 4,2	rekombinantes bovines ECE-1 in CHO-Zellen; Xu et al., 1994
10 : 1 : 0	rekombinantes humanes ECE-1 in CHO-Zellen; Schmidt et al., 1994
40 : 2,5 : 1	EA.hy926-Zellen, aufgereinigte Membranen; Ahn et al., 1995

Tab. 1: Substratspezifität von ECE-1, angegeben durch verschiedene Autoren

ECE-2 ist ebenfalls ein Typ II Transmembranprotein mit einer 82 Aminosäuren umfassenden N-terminalen zytoplasmatischen Domäne und einem großen extrazellulären Anteil von 682 Aminosäuren, welcher die Substratbindungsstelle enthält. Auch die Substratspezifität gleicht ungefähr der von ECE-1: big ET-1 > big ET-2 > big ET-3. Im Gegensatz zu ECE-1 hat ECE-2 jedoch ein pH-Optimum von 5,5, was die Vermutung nahelegt, daß das Enzym intrazellulär im sauren Milieu des trans-Golgi Netzwerkes katalytisch aktiv ist (Emoto und Yanagisawa, 1995).

Zwischen ECE-1 und -2 besteht eine 59%ige Homologie in der Aminosäuresequenz, im C-terminalen Anteil ist die Ähnlichkeit mit 71% noch größer (Emoto und Yanagisawa, 1995). Eine 37%ige Homologie zu ECE-1 auf Proteinebene findet sich für die neutrale Endopeptidase (NEP), die am Metabolismus u.a. von Enkephalinen, ANP, Substanz P, Oxytocin und chemotaktischen Peptiden beteiligt ist (Ishimaru und Shipp, 1995; Turner und Murphy, 1996; Turner et al., 2001).

ECE-3 hat mit 140 kDa ein etwas größeres Molekulargewicht als ECE-1 und -2 (Molekulargewicht von ca. 130 kDa). Es zeigt eine ausgesprochene Substratspezifität für big ET-3 gegenüber big ET-1, wobei das pH-Optimum bei 6,6 liegt (Hasegawa et al., 1998). Die cDNA für ECE-3 wurde bis heute jedoch nicht kloniert.

Gemeinsam mit NEP, XCE (ECE-1) und dem Blutgruppenantigen *Kell* bilden ECE-1 und ECE-2 die Neprilysinfamilie Zink-bindender Metalloproteasen (Turner und Tanzawa, 1997). Alle drei Endothelin-Konvertierungsenzyme lassen sich durch Phosphoramidon, ein substituiertes Dipeptid, hemmen. Durch Thiorphan, einen spezifischen Hemmstoff der Neutralen Endopeptidase, oder ACE-Hemmer werden sie in ihrer Aktivität hingegen nicht beeinflusst (Matsumura et al., 1995; Turner und Murphy, 1996; Hasegawa et al., 1998).

3.2.3 Gewebeexpression

Eine immunhistochemische Untersuchung der **ECE-1** Expression in Rattengeweben weist das Enzym vor allem in den Endothelzellen von Aorta abdominalis, Lungenarterien und -venen, Interlobärarterien der Niere und Leber, Portalvene und Herzendothel nach, nicht aber in glatten Muskelzellen der Rattenaorta (Takahashi et al., 1995). Dagegen zeigen Hioki et al. in ihrer Arbeit von 1991 durch Inkubation von Homogenaten aus bovinen glatten Muskelzellen mit big ET-1 und anschließender ET-1 Detektion ECE-Aktivität auch in diesem Zelltyp. Die RT-PCR-Detektion von ECE-1b mRNA in kultivierten glatten Muskelzellen erweitert diesen Nachweis auf die humane Spezies (Orzechowski et al., 1997). Beim Rind zeigen Northern Blot-Analysen von Xu et al. und Ikura et al. (1994) ECE-1-Expression in Lunge, Herz, Leber, Niere, Nebenniere, Milz, Ovar, Uterus, Hoden, Skelettmuskel und ZNS. Durch *in situ* Hybridisierung in der Arbeit von Xu et al. können dabei die Gefäßendothelzellen der untersuchten Organe als hauptsächlicher Expressionsort der Signale identifiziert werden. Darüber hinaus finden sich im bovinen Herz ECE-1 mRNA-Signale im Endokard und in den Kardiomyozyten. In der Lunge wird das Enzym auch in epithelialen Zellen nachgewiesen. Ebenso zeigt sich eine schwächere Detektion von ECE-1 in den Tubulusepithelzellen der Niere und den Epithelzellen der Nebenniere in Kortex und Mark. Über die physiologische Verteilung von ECE-1 mRNA und Protein in Geweben und Zelltypen des Menschen gibt sehr detailliert die Arbeit von Korth et al. (1999) Auskunft. Die dort beschriebenen Ergebnisse sollen im folgenden nur auszugsweise dargestellt werden: Im kardiovaskulären System finden

sich hohe mRNA- und Proteinspiegel in nahezu allen Gefäßendothelzellen, unabhängig vom untersuchten Organ. Dagegen differieren sie in den glatten Muskelzellen sowohl des gleichen Gefäßes als auch zwischen verschiedenen Gefäßen stark. In humanen Kardiomyozyten läßt sich ECE-1 in dieser Arbeit im Gegensatz zu den Northern Blot-Daten für das Rind von Xu et al. (1994) nicht nachweisen. ECE-1 wird mit Ausnahme des hyalinen Knorpels im gesamten respiratorischen System exprimiert. Im Gastrointestinaltrakt findet sich das Protein in geringer Konzentration in den Epithelzellen und in der Tunica muscularis; dagegen ist die Expression im Plexus myentericus Auerbach und in den submukösen Plexus stark, ebenso wie in den Azinuszellen des Pankreas. In der Niere wird ECE-1 vornehmlich im Bereich der Glomeruli detektiert. Über die isoformspezifische mRNA-Expression der drei Isoformen ECE-1a, -1b und -1c beim Menschen geben die von Schweizer et al. 1997 mittels RNase Protection Assay generierten Daten Auskunft. Danach wird ECE-1c in nahezu allen untersuchten Geweben als Hauptisoform exprimiert, so z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber, Nebenniere und Plazenta. In HUVEC dominiert dagegen die ECE-1a mRNA. Die Expression von ECE-1 mRNA in der embryonalen Entwicklung wurde mittels *in situ* Hybridisierung untersucht (Brand et al., 1998). Im humanen Embryo des Carnegie Stadiums 12-13 (4./5. Woche) zeigt sich eine starke mRNA-Expression im Endokard und den Endothelzellen aller Arterien. Hepatozyten und das mesodermale Gewebe um den Hauptbronchus weisen ECE-1 auf. In der 5. und 6. Gestationswoche wird ECE-1 mRNA in Myozyten und Endothelzellen sowohl kardial als auch vaskulär exprimiert. Des weiteren läßt es sich im Mesoderm des gesamten Verdauungstraktes, im Pankreasepithel und -mesoderm sowie in den Hepatozyten nachweisen. Im Mesonephros wird ECE-1 mRNA im proximalen Tubulus, Mesenchym und Mesangium exprimiert.

Daten zur Gewebeexpression von **ECE-2** liegen nur für das Rind vor. So weisen Northern Blot-Analysen große Mengen an ECE-2 mRNA im zerebralen Kortex, Zerebellum und der Nebenniere nach, schwächere Signale werden im Myometrium, Ovar und Hoden detektiert. Endothelzellen von Koronararterien und HUVEC zeigen ebenfalls ECE-2 mRNA (Emoto und Yanagisawa, 1995; Russell und Davenport, 1999). Insgesamt sind die Mengen an ECE-2 mRNA jedoch deutlich geringer als die von ECE-1.

3.2.4 Bedeutung der Endothelin-Konvertierungsenzyme

Die Bedeutung von ECE-1 für die Gewebedifferenzierung in der Ontogenese wird anhand der *knock out* Mausmodelle von Yanagisawa et al. (1998) deutlich, bei denen beide Allele für ECE-1 ausgeschaltet wurden. Die meisten dieser Tiere verstarben bereits intrauterin und die wenigen lebendgeborenen Mäuse lebten aufgrund unzureichender Atmung nicht länger als etwa 30 min postpartal. Dabei waren die oberen Atemwege aufgrund einer Fusion von thyreoidalem Knorpel, Hyoid und der Basis des Sphenoids verengt. Es fanden sich schwere kraniofaziale Fehlbildungen (Hypoplasie von Mandibula, hartem Gaumen und temporalem Schädelknochen). Große Teile der Zunge und der submandibulären und sublingualen Drüsengänge wie auch der äußere Gehörgang, Malleolus und Incus fehlten. Thyreoidea und Parathyreoidea waren lediglich teilweise entwickelt. Hinzu kamen ausgeprägte Malformationen der herznahen Gefäße (periphere Gefäßdilatationen, Hypoplasie des Aortenbogens zwischen linker A. carotis communis und A. subclavia, Fehlen der rechten A. subclavia, rechtsseitiger oder doppelter Aortenbogen). Am Herz fielen verschiedene konotrunkale Fehlbildungen auf (perimembranöser Ventrikelseptumdefekt, überreitende Aorta, doppelter Ausflußtrakt des rechten Ventrikels und persistierender Truncus arteriosus). Die Choroidea der homozygoten Tiere war nicht pigmentiert, auch konnten keine Melanozyten in der Haut des Rückens detektiert werden. In Gewebeschnitten des Rektums fehlten darüber hinaus die enterischen Neurone. Dies bedeutet, daß das Fehlen von ECE-1 die Differenzierung von vier spezifischen Gruppen von Neuralrohrderivaten beeinflusst: (1) kraniofaziale Strukturen aus dem zephalischen Neuralrohr, (2) große Gefäße und

die konotrunkale Region aus dem kardialen, (3) enterische Neurone aus dem vagalen Neuralrohr sowie (4) epidermale und choroidale Melanozyten aus dem Neuralrohr des Stammes. Damit faßt dieser Phänotyp das Erscheinungsbild der ET-1/ETA und ET-3/ETB *knock out* Tiere zusammen und verweist auf die zentrale Rolle von ECE-1 bei den über Endotheline vermittelten Signaltransduktionswegen im Rahmen der Ontogenese. ECE-2-defiziente Mäuse waren gesund und fertil ohne nachweisbare Defekte in der embryonalen oder adulten Entwicklung. Dagegen zeigten Embryonen, die weder ECE-2 noch ECE-1 exprimierten, eine qualitative Zunahme der kardialen Fehlbildungen vor allem im Bereich des AV-Kanals, welche bei den ECE-1 *knock out* Tieren nicht beobachtet wurden (Yanagisawa et al., 2000). Die Fallbeschreibung eines Patienten mit Morbus Hirschsprung, kardialen Defekten, kraniofazialen Fehlbildungen und autonomer Dysfunktion, bei dem eine Mutation im Exon 19 des ECE-1 Gens mit Austausch der Aminosäure Arginin zu Cystein an Position 742 detektiert wurde, unterstreicht die Bedeutung von ECE-1 auch bei der humanen Ontogenese (Hofstra et al., 1999).

ECE-1 spielt des weiteren eine pathophysiologische Rolle bei kardiovaskulären Krankheiten. Im Neointimamodell nach Ballonkatheterverletzung der Arteria carotis der Ratte wurde eine Hochregulation der ECE-1 mRNA und darüber hinaus eine Zunahme der Enzymaktivität im Anschluß an die Ballondilatation in den glatten Muskelzellen der Neointima nachgewiesen (Minamino et al., 1997). Die chronische Applikation von Phosphoramidon konnte in diesem Modell die Ausprägung der Stenose reduzieren. Beim Menschen fand sich eine Expression von ECE-1 auch in Endothelzellen, VSMC und in Makrophagen im Bereich arteriosklerotischer Läsionen erkrankter Koronararterien (Minamino et al., 1997; Davenport und Kuc, 2000; Ihling et al., 2001). In Mäusen, die aufgrund einer Enzephalomyokarditis-Virus Infektion eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, wurde eine Hochregulation der ECE-1 mRNA beschrieben (Ono et al., 1999). Bei der humanen dilatativen Kardiomyopathie ist die Datenlage widersprüchlich: Zolk et al. konnten keine Expressionsänderung im linken Ventrikel nachweisen; eine andere Arbeit zeigte dagegen sowohl eine akzelerierte Expression als auch eine vermehrte Aktivität von ECE-1 bei der dilatativen Kardiomyopathie (Zolk et al., 1999; Ergul et al., 2000). Bei der humanen

ischämischen Kardiomyopathie wurde in Myozyten und im linken Ventrikel eine Hochregulation von ECE-1 mRNA mit Zunahme der ECE-1 Aktivität beschrieben (Ergul et al., 2000; Seneri et al., 2000).

Erst kürzlich wurde von Eckman et al. beschrieben, daß ECE-1 das bei Morbus Alzheimer akkumulierende Peptid β -Amyloid abbauen kann und daß die verminderte ECE-1 Aktivität bei heterozygoten *knock out* Mäusen mit einer Erhöhung der zerebralen Konzentration an β -Amyloid einhergeht (Eckman et al., 2001 und 2003). Inwieweit eine pharmakologische ECE-Inhibition zu einer Zunahme der β -Amyloid-Spiegel im humanen Gehirn führt bzw. ob eine Hochregulation des Enzyms einen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung des Morbus Alzheimer haben könnte, läßt sich zur Zeit nicht beantworten.

3.3 Prinzipien der isoformspezifischen Genexpression

3.3.1 Allgemeine Grundsätze

Als Mechanismen der Expression verschiedener mRNAs aus einem einzelnen Gen stehen der Eukaryontenzelle bereits auf der Ebene der Gentranskription grundsätzlich drei Prinzipien zur Verfügung: Initiierung mehrerer Primärtranskripte über alternative Promotoren, differentielles Spleißen eines Primärtranskriptes oder differentielle Termination bzw. posttranskriptionale Prozessierung am 3'-Ende (Ayoubi und van de Ven, 1996). Im weiteren soll - auch im Hinblick auf die bisher bekannten Regulationsabläufe beim ECE-1 Gen - lediglich das Prinzip der alternativen Promotoren erläutert werden.

Promotoren sind Initiationsstellen der Transkription auf der DNA-Matrize, die sich direkt 5' des ersten Exons eines Gens befinden, damit den Transkriptionsstartpunkt enthalten und Bindungsstellen für den basalen Transkriptionsapparat darstellen. An den Transkriptionsstartpunkten eines Gens beginnt die Synthese der spezifischen mRNA durch Anlagerung der RNA-Polymerase II, die zur Promotorerkennung und Initiation der Transkription weitere Proteine benötigt (Zawel und Reinberg, 1995).

Diese werden als basale Transkriptionsfaktoren bezeichnet und umfassen die Proteine TFIIA, -B, -D, -E, -F und -H. Diese TFIIIX bestehen wiederum jeweils aus mehreren Proteinuntereinheiten, die zum Teil DNA-bindende Proteine sind, aber auch Helikase- oder Proteinkinaseaktivität aufweisen können (Goodrich et al., 1996; Roeder, 1996). Der TFIID Komplex ist dabei verantwortlich für die Promotorerkennung, indem sich zum einen eine Untereinheit dieses Komplexes, das TATA-bindende Protein (TBP), an die sogenannte TATA-Box anlagert und zum anderen weitere Einheiten, bekannt als TBP-assoziierte Faktoren (TAFs), mit flankierenden Sequenzen interagieren und damit die Spezifität der Bindung erhöhen (Albright und Tjian, 2000). Nun kann TFIIIB angelagert werden und im folgenden die RNA-Polymerase positionieren (Goodrich et al., 1996; Roeder, 1996; Kornberg, 1999). Zur Zeit sind 13 verschiedene TAFs (TAF1 bis TAF13) bekannt, die als Untereinheiten von TFIID den basalen Transkriptionskomplex mit Domänen der Transkriptionsaktivierung verknüpfen können und damit die mRNA-Synthese initiieren, ohne daß TBP dabei an den Promotor bindet (Pugh und Tjian, 1990; Tjian und Maniatis, 1994; Butler und Kadonaga, 2002; Tora, 2002). Die TATA-Box ist bei etwa -25 lokalisiert. Deren Konsensussequenz ist T₈₂ A₉₇ T₉₃ A₈₅ A₆₃ A₈₈ A₅₀, wobei der Index das prozentuale Vorkommen der Base in dieser Position angibt (Weil et al., 1979). Einige TATA-Boxen werden direkt 5' von dem sogenannten TFIIIB *recognition element* (BRE) flankiert, welches die Konsensussequenz G/C G/C G/A C G C C aufweist und eine Bindungsstelle für den für die Positionierung der RNA-Polymerase II wichtigen basalen Transkriptionsfaktor TFIIIB darstellt (Kadonaga, 2002). In einigen Promotoren liegt ein weiteres Element vor, welches in Analogie zur TATA-Box den Transkriptionsstart auch bei fehlendem TATA-Element festlegen kann oder mit diesem kooperiert (Smale und Baltimore, 1989; Smale et al., 1990; O'Shea-Greenfield und Smale, 1992; Smale, 1997). Dieser sogenannte Initiator (Inr) ist unidirektional und überlappt den Startpunkt (O'Shea-Greenfield und Smale, 1992), wobei durch eine große Varianz in den Sequenzen, welche Inr-Aktivität aufweisen, eine Konsensussequenz lediglich annähernd festgelegt werden kann als Pyr Pyr A₊₁ N T/A Pyr Pyr (Javahery et al., 1994). Das Inr-Element wird ebenso wie die TATA-Box spezifisch von TFIID erkannt (Kaufmann und Smale, 1994; Burke und Kadonaga, 1996; Weis und Reinberg, 1997). Zudem belegen mehrere Studien für

einige Promotoren die kritische Rolle eines Elements, das 20 bis 40 bp 3' vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist und deshalb als *downstream promoter element* (DPE) bezeichnet wird (Biggin und Tjian, 1988; Soeller et al., 1988; Jarrell und Meselson, 1991; Burke und Kadonaga, 1996). Die Kernsequenz des DPE-Motivs ist $A/G_{+28} G A/T C/T G/A/C_{+32}$ mit einer zusätzlichen Präferenz für ein G an Position +24. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Bindung von TFIID an das DPE gleichzeitig und in Koordination mit der Bindung an den Inr erfolgt (Burke und Kadonaga, 1996; Kadonaga, 2002). Inr und TATA-Box sind Strukturen des Kernpromotors, wobei ein Promotor entweder beide, nur eines der beiden, aber auch keines der Elemente aufweisen kann (Novina und Roy, 1996). Weiter 5' schließt sich der proximale Promotor an, der etwa 200-300 Nukleotide 5' vom Transkriptionsstartpunkt umfaßt. Hier ist häufig die sogenannte CAAT-Box als Bindungsstelle modulierender Transkriptionsfaktoren lokalisiert (Werner, 1999).

Darüber hinaus stehen Eukaryonten für eine entwicklungs- und gewebespezifische sowie stimulusabhängige Gentranskription diverse zusätzliche, spezifische Sequenzabfolgen der genomischen DNA noch weiter 5' zur Verfügung, an die ebenfalls Transkriptionsfaktoren binden und damit die basale Genexpression hemmen oder verstärken können. Diese Peptide werden auch als regulatorische Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Eine Sonderstellung nehmen hierbei die *Enhancer* und *Silencer* ein, die in beträchtlichem Abstand sowohl 5' als auch 3' vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert sein können und ihre verstärkende oder hemmende Wirkung auf die Promotoraktivität im Gegensatz zu den anderen regulativen Elementen sowohl in 5'-3'-, als auch in reverser Orientierung entfalten. Zusammengefaßt bedeutet dies, daß ein Promotor sowohl konstitutive Elemente als auch regulatorische Sequenzen aufweist, die neben der basalen Transkriptionsrate auch eine fein regulierte Genexpression ermöglichen.

Bei Genen, die **alternative Promotoren** besitzen, können verschieden starke Promotoren genutzt werden, um in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich hohe Spiegel an mRNA zu generieren. Im Fall des α -Amylase Gens findet sich ein schwacher, leberspezifischer Promotor und ein zweiter, weiter 5' gelegener starker

Promotor, der in der Speicheldrüse aktiv ist und dort zu 100-fach höheren Expressionsspiegeln der α -Amylase im Vergleich zum Lebergewebe führt. Weiterhin kann ein alternativer Promotor eine zellspezifische Regulation sicherstellen. Gleiches gilt für die temporäre Genexpression in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium im wachsenden Organismus und die Möglichkeit, durch verschiedene Promotorregionen auf spezifische zelluläre und metabolische Einflüsse reagieren zu können. Am Beispiel der Familie der *Insulin-like growth factors* (IGF) wird dieser Zusammenhang verdeutlicht: Das IGF-II Gen weist 4 Promotoren 5' vom ersten kodierenden Exon auf. Während der Fetalentwicklung sind zunächst die Promotoren 2, 3 und 4 aktiv, die in der Leber nach der Geburt zeitgleich mit der Aktivierung des Promotors 1 abgeschaltet werden. Der Promotor 1 von IGF-I wird in den meisten fetalen und adulten Geweben exprimiert, wohingegen der zweite Promotor vornehmlich postnatal und dann hauptsächlich in der Leber aktiv ist. Lediglich die Aktivität dieses Promotors 2 zeigt dabei eine Abhängigkeit von Somatotropin, welches in der Leber die Bildung von IGF-I stimuliert. Außerdem können mRNA-Isoformen generiert werden, die allein durch Unterschiede in ihrer 5'-untranslatierten Region eine unterschiedliche Stabilität und Translationseffizienz aufweisen. Wenn das durch einen alternativen Promotor produzierte führende Exon kodierende Sequenzen enthält, kann schließlich eine Veränderung der Primärstruktur des Proteins an dessen Aminoterminus eintreten, d.h. multiple Proteinisoformen können von einem einzelnen Gen kodiert werden. Das humane Porphobilinogen-Deaminase-Gen enthält zum Beispiel einen sogenannten *housekeeping* - also einen ubiquitär aktiven und nicht regulierten - sowie einen gewebespezifischen Promotor. Die dadurch generierten alternativen ersten Exone enthalten beide ein Proteininitiationskodon, durch das zwei Proteinisoformen gebildet werden können, von denen die eine in allen Geweben und die zweite lediglich in Zellen der Erythropoese aktiv ist (Schibler und Sierra, 1987; Ayoubi und van de Ven, 1996).

3.3.2 Isoformspezifische Genregulation des ECE-1

1995 ergab die Arbeit von Valdenaire et al. durch Detektion multipler potentieller Transkriptionsstartpunkte 5' der damals bekannten Exone 1 (ECE-1b) und 3 (ECE-1a) erste Hinweise auf das Vorliegen von alternativen Promotoren für die

isoformspezifische Transkription der ECE-1 Isoformen a und b. Kurze Zeit später konnte die funktionelle Aktivität dieser alternativen Promotorsequenzen durch Reporterassays nachgewiesen und die beteiligten *cis*-Elemente genauer charakterisiert werden (Orzechowski et al., 1997; Funke-Kaiser et al., 1998). Beiden Promotoren fehlen die typischen Inrs, TATA- oder CAAT-Boxen. Charakteristisch für den ECE-1b Promoter ist das Vorliegen multipler Konsensussequenzen für den Transkriptionsfaktor Sp1 in der GC-reichen Region um die Position -31 vor dem ATG in Exon 1b, was für TATA-Box-lose Promotoren typisch ist. Sp1 spielt bei TATA-Box losen Promotoren eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsinitiation (Kadonaga et al., 1986; Pugh und Tjian, 1991). Auch in der Promotorregion der ECE-1d Isoform zwischen Exon 1b und 2, dessen Funktionalität Valdenaire et al. 1999a zeigten, liegen zwei Sp1-Konsensussequenzen.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser experimentellen Arbeit waren somit drei Promotoren bekannt, die die Regulation der Transkription von ECE-1 jeweils 5' der Exone 1b (ECE-1b), 1d (ECE-1d) und 3 (ECE-1a) steuern. Die Primärtranskripte werden dann in Abhängigkeit von den erkannten Spleißdonor- und -akzeptorstellen zu den jeweiligen mRNA-Isoformen prozessiert.