

4 Fragestellung

Die einzelnen ECE-1 Isoformen weisen zwar eine ähnliche Enzymkinetik auf, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und Zell- bzw. Gewebeexpression (Russell et al., 1998; Orzechowski et al., 1997; Parnot et al., 1997; Valdenaire et al., 1995). Über die isoformspezifische Regulation der Expression von ECE-1 und die Bedeutung hierbei beteiligter Transkriptionsfaktoren unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ist dagegen wenig bekannt. Durch Vergleich von Untersuchungen der mRNA-Expression der bisher bekannten ECE-1 Isoformen wird deutlich, daß es sich bei der ECE-1c Isoform in den meisten untersuchten Geweben und Zellen um die Hauptisoform des Endothelin-Konvertierungsenzyms handelt (Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999a).

In dieser Arbeit sollte daher die transkriptionelle Regulation der c-spezifischen Isoform des humanen Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 in endothelialen und epithelialen Zellsystemen untersucht werden. Im einzelnen wurde dazu folgendermaßen vorgegangen:

1. Zunächst wurde Exon 1c des humanen ECE-1 Gens in einer genomischen Datenbank identifiziert und nachfolgend die 5' Region mit dem vermuteten ECE-1c Promotor kloniert.
2. Der Nachweis von funktioneller Promotoraktivität erfolgte mit Hilfe von Reporterassays in transient transfizierten endothelialen und epithelialen Zellen.
3. Als weiterer Beweis für die Funktionalität des Promotors wurden die Transkriptionsstartpunkte der ECE-1c Isoform bestimmt.
4. Schließlich folgten funktionelle Untersuchungen einzelner Promotorelemente, die durch bioinformatische Analyse als Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktorbindung identifiziert wurden. Dazu erfolgte auf der Basis der Sequenzanalyse erstens die Herstellung von Deletionsmutanten, zweitens wurde

durch das Einfügen von Punktmutationen innerhalb definierter Bindungsstellen regulatorischer Proteine die Bedeutung spezifischer Transkriptionsfaktoren für die Genregulation genauer untersucht.

5. Abschließend wurden ECE-1c Promotoraktivität und ECE-1c mRNA-Spiegel verglichen und die ECE-1c Promotoraktivität im Vergleich zu den ECE-1a- und -1b-spezifischen Promotoren analysiert.