

7 Diskussion

7.1 Charakterisierung des ECE-1c Promotors

7.1.1 Strukturelle Merkmale in Bezug auf die Transkriptionsinitiation

In dieser Arbeit konnte das c-spezifische Exon des humanen ECE-1 Gens genomisch lokalisiert, die Transkriptionsstartpunkte determiniert und der ECE-1c-spezifische Promotor kloniert sowie funktionell charakterisiert werden. Das Exon 1c liegt 55 kbp 5' des ECE-1b Exons und ist damit das am weitesten 5' lokalisierte isoformspezifische Exon des humanen ECE-1 Gens.

Mittels RPA wurden drei protektierte Fragmente mit einer Größe von etwa 110 bp, 140 bp und - mit geringerer Signalintensität - von etwa 350 bp detektiert, was Transkriptionsstartpunkten an den Positionen -110, -140 und -350 relativ zum ATG in Exon 1c entspricht. Anhand der Signalintensität kann man von zwei Hauptstartpunkten bei -110 und -140 sowie einem Nebenstartpunkt bei -350 ausgehen. Das RPA-Ergebnis wurde durch 5'-RACE im wesentlichen bestätigt. Die Gelelektrophorese zeigte eine Doppelbande bei etwa 130 bp, was transkriptionellen Startpunkten bei etwa 110 bp entspricht. Die Differenz der Basenpaare ergibt sich dabei nach Abzug des im ersten Schritt der RACE künstlich angefügten Poly-G-Ankers. Subklonierung und Sequenzierung des RACE-Produktes bestätigten die Spezifität des Fragmentes und detektierten die 5'-Enden an den Positionen -101 und -106 relativ zum Translationsstartpunkt. Der RPA zur Analyse der ECE-1c Transkriptionsstartpunkte in HUVEC zeigt die stärkste Signalintensität für das geschützte Fragment von 110 bp, welches auch in der RACE detektiert wird, so daß das Fehlen der Banden für die Transkriptionsstartpunkte -140 und -350 in der RACE möglicherweise durch die geringere Transkriptmenge bedingt ist.

Der hier untersuchte c-spezifische Promotor des Gens für ECE-1 enthält keine TATA-Box, ebenso fehlt nach Sequenzanalyse unter Verwendung der TRANSFAC-Sequenzdatenbank ein Inr-Element, welches in Analogie zur TATA-Box eine exakte

und effiziente Transkriptionsinitiation dirigieren kann. Die Existenz multipler Transkriptionsstartpunkte wie im ECE-1c Promotor verweist darauf, daß die Initiation aufgrund des Fehlens eindeutiger Kernpromotorelemente hier unpräzise abläuft, was in TATA⁻Inr⁻-Promotoren nicht ungewöhnlich ist (Weis und Reinberg, 1992; Geng und Johnson, 1993). TATA⁻Inr⁻-Promotoren wurden mit *housekeeping*-Funktionen in Zusammenhang gebracht (Lu et al., 1994; Novina und Roy, 1996; Roeder, 1996).

Als bekanntes Strukturelement proximaler Promotoren werden zwei CAAT-Boxen an den Positionen -196 bis -185 und -220 bis -209 detektiert, auf deren Bedeutung unter **7.1.2** näher eingegangen werden soll. Auffällig ist darüber hinaus der GC-Reichtum des ECE-1c Promotors. So weist das Konstrukt -968 einen GC-Gehalt von 64% auf, was ebenfalls mit *housekeeping*-Funktionen in Verbindung gebracht wurde (Schibler und Sierra, 1987). Eine ausführliche Darstellung dieser Eigenschaft des ECE-1c Promotors erfolgt im Abschnitt **7.1.3**.

7.1.2 Räumliche Assoziation von Transkriptionsstartpunkten mit strukturellen Promotorelementen

Die Transfektionsexperimente in der vorliegenden Arbeit zeigten für den Promotorbereich zwischen -142 und -240 relativ zum Translationsstartkodon den stärksten Anstieg der Promotoraktivität. Hier sind Konsensussequenzen für die Bindung von E2F und Sp1 sowie zwei CAAT-Boxen lokalisiert (**Abb. 24**), die anstelle fehlender TATA-Box und Inr die basale Transkription der ECE-1c mRNA initiieren und den Transkriptionsstart festlegen könnten. Die Bedeutung dieser Konsensussequenzen als regulative Elemente im Rahmen der Transkription soll im folgenden diskutiert werden.

Die zwei **CAAT-Boxen** liegen an den Positionen -196 bis -185 und -220 bis -209 (überlappend mit einer GATA-Bindungsstelle). Die CAAT-Box ist ein häufiges Element in eukaryotischen Promotoren und in TATA-loser Promotoren meist in reverser Orientierung zwischen -41 und -80 relativ zum Startpunkt der Transkription

lokalisiert (Mantovani, 1998). Damit liegen beide im ECE-1c Promotor gefundenen CAAT-Boxen in passendem Abstand zu den ermittelten Transkriptionsstartpunkten bei etwa -110 und -140. Es gibt mehrere Proteine, die an die CAAT-Konsensussequenz binden können, darunter *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP), *CCAAT transcription factor/nuclear factor-1* (CTF/NF-1), *CCAAT displacement protein* (CDP) und NF-Y (Synonyme sind CBF oder CP1) (Alonso et al., 1996; Mantovani, 1998). NF-Y ist ein ubiquitär exprimiertes Proteinheteromer, welches sich aus drei Untereinheiten (NF-YA, NF-YB, NF-YC) zusammensetzt, die alle für die DNA-Bindung benötigt werden (Sinha et al., 1995). Die Transfektionsexperimente haben besonders für die Promotorregion zwischen -217 und -240 eine starke Beeinflussung der Promotoraktivität gezeigt. Dieser Bereich weist die CAAT-Box zwischen -220 und -209 mit dem überlappenden GATA-Motiv auf. Durch Nachweis der Bindung der NF-Y Untereinheit NF-YB an dieses *cis*-Element konnte die Funktionalität dieser Konsensussequenz bezüglich der Transkriptionsinitiation bestätigt werden (Funke-Kaiser et al., 2003a).

Der untersuchte Promotor der ECE-1c Isoform zeigt eine Konsensussequenz für **E2F** bei -158 bis -151 (relativ zum Translationsstartkodon), die damit unmittelbar 5' eines der Transkriptionsstartpunkte bei etwa -140 liegt. E2F ist als ein Transkriptionsfaktor beschrieben, dessen Konsensussequenz häufig direkt neben dem Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist oder diesen überlagert (Kel et al., 2001). Durch Interaktion mit den basalen Transkriptionsfaktoren TBP und TFIIF kann E2F direkt oder in Kooperation mit Sp1 die Transkription des nachgeschalteten Gens initiieren, was vor allem in TATA-losen Promotoren von Bedeutung ist (Emili und Ingles, 1995; Pearson und Greenblatt, 1997; Fry und Farnham, 1999). Die durch die Punktmutation der Deletionsmutante -490 in diesem *cis*-Element nachweisbare starke Reduktion der Promotoraktivität um 79% spricht für eine zentrale Bedeutung von E2F bei der basalen Transkriptionsregulation von ECE-1c. Die E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus 6 Mitgliedern (E2F-1 bis -6), die jeweils mit Proteinen einer anderen Genfamilie (DP-1 und DP-2) ein Heterodimer bilden. Als Komplex binden sie gemeinsam an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb von

Promotorregionen ihrer Zielgene und regulieren dadurch deren Transkription. Eine zentrale Rolle spielt E2F dabei bei der Expressionsregulation von Genen, die die zelluläre DNA-Synthese und Proliferation in Abhängigkeit vom Zellzyklus kontrollieren, darunter Tumor-Suppressorgene, Protoonkogene und Gene der Zellzyklusprogression wie Cyclin A, Cyclin E und Cyclin D3 (Sladek, 1997; Fry et al., 1999; Ma et al., 2003). Die DNA-Bindung kann die nachfolgende Transkription sowohl aktivieren als auch unterdrücken in Abhängigkeit vom Stadium des Zellzyklus und dem Vorhandensein weiterer Proteine, die mit E2F interagieren wie p53 und Retinoblastomproteine (Müller und Helin, 2000). E2F-1, -2 und -3 bilden eine Untergruppe von aktivierenden E2Fs, wohingegen E2F-4, -5 und -6 transkriptionelle Repression vermitteln (Takahashi et al., 2000; Trimarchi und Lees, 2002). Erst kürzlich wurde für die unterschiedliche Bindungsaffinität von E2F-2 an ein polymorphes *cis*-Element im ECE-1b Promotor eine Assoziation mit essentieller Hypertonie bei Frauen nachgewiesen und damit eine mögliche neue Funktion für Proteine der E2F-Familie bei der Blutdruckregulation gefunden (Funke-Kaiser et al., 2003b). In unserer Arbeitsgruppe konnte mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) von nukleären Proteinextrakten aus EA.hy926 gezeigt werden, daß an die E2F-Konsensussequenz an Position –158 bis –151 im ECE-1c Promotor das Protein E2F-2 bindet (Funke-Kaiser et al., 2003a).

Im ECE-1c Promotor finden sich zwei Konsensussequenzen für **Sp1**, eine an Position –180 (relativ zum Translationsstartkodon) und eine weitere bei –880. Die Proteine der Sp1-Familie (Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4) binden an GC-reiche Sequenzen – sogenannte GC-Boxen - und können in Abhängigkeit des Promotorkontextes sowohl als basales Promotorelement, aber auch im Rahmen eines weiter 5' lokalisierten Aktivators agieren. Bei Genen, deren Promotor keine TATA-Box aufweist (was auch auf den untersuchten ECE-1c Promotor zutrifft), kann eine Sp1-Bindungsstelle die kritische Determinante der transkriptionellen Aktivierung darstellen und durch Interaktion mit TFIID den Startpunkt der Transkription positionieren (Pugh und Tjian, 1990; Smale et al., 1990; Pugh und Tjian, 1991; Lu et al., 1994; Emami et al., 1995; Körner et al., 1997; Saluja et al., 1998). Der Faktor kann jedoch auch aus

großer Distanz zum Startpunkt mittels Protein-Protein-Interaktionen und DNA-Faltung die Transkription verstärken, indem durch diese Veränderung der DNA-Struktur weit distal gelegene Aktivatoren in die Nähe des basalen Transkriptionskomplexes gebracht werden (Fry und Farnham, 1999). Diese Eigenschaften von Sp1 können durch die Anwesenheit anderer Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden. Als Beispiele seien das Gen für die Pyruvatkinase der Retikulozyten erwähnt, das Sp1 mit Mitgliedern der GATA-Familie synergistisch reguliert (Gregory et al., 1996), und die Kooperation mit E2F bei der Aktivierung des Gens der humanen DNA-Polymerase α (Lin et al., 1996). Für beide Faktoren wurden auch im ECE-1c Promotor Konsensusstellen nachgewiesen. Sp1-regulierte Promotoren weisen häufig multiple Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor auf, wobei die wichtigste Stelle diejenige ist, welche 40 bis 70 Nukleotide 5' vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert ist (Kadonaga et al., 1986). Die proximale Sp1-Konsensussequenz im ECE-1c Promotor (bei -180) liegt 40 bp 5' vom detektierten Transkriptionsstart bei -140 und 70 bp 5' von den Startpunkten bei -110. Die Präsenz der Sp1-Konsensussequenz bei -180 in Konstrukt -217 führte zu einer Zunahme der Reporterogenaktivität um den Faktor 6 im Vergleich zu -142 in MCF7-Zellen. In der weiterführenden Charakterisierung des ECE-1c Promotors konnte durch Punktmutation dieses *cis*-Elements eine deutliche Reduktion der Promotoraktivität erreicht werden, was die Bedeutung von Sp1 für die transkriptionelle Initiierung von ECE-1c unterstreicht (Funke-Kaiser et al., 2003a).

7.1.3 Regulatorische Komponenten des Promotors

Auf die Bedeutung möglicher regulatorischer Komponenten des ECE-1c Promotors verweisen die Unterschiede in den Reporterogenaktivitäten der Promotorkonstrukte -217/-240 sowie -409/-490. Im erstgenannten Sequenzbereich liegt eine GATA-Konsensussequenz (-232 bis -223); im zweiten Abschnitt ist eine mit GATA (-420 bis -411) überlappende ETS-Konsensussequenz (-426 bis -417) lokalisiert (**Abb. 24**).

GATA-Faktoren bestehen aus einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die zwar strukturell verwandt sind, aber in ihrer jeweiligen Expression auf ein bestimmtes Muster von Zelltypen beschränkt sind. Es gibt sechs verschiedene Mitglieder der GATA-Familie, die alle ein sogenanntes Zinkfinger-Motiv in ihrer Proteinstruktur aufweisen. GATA-4/-5/-6 werden in Herz und Darm sowohl des sich entwickelnden als auch des adulten Organismus exprimiert (Simon, 1995; Evans, 1997; Sakai et al., 1998; Charron et al., 1999). GATA-4-defizienten Mäuseembryonen fehlt die Anlage des primitiven Herzschauches durch Ausbleiben der ventralen Faltung (Kuo et al., 1997; Molkenin et al., 1997). In einem Rattenmodell der linksventrikulären Hypertrophie induziert GATA die Expression des kardialen Hypertrophie-Markers *β-Myosin heavy chain* und des AT₁A-Rezeptors (Hasegawa et al., 1997; Molkenin und Olson, 1997). Außerdem wurden GATA-4-Mutationen bei kongenitalen septalen Herzfehlern identifiziert (Garg et al., 2003), die in ähnlicher Form bei ECE-1-defizienten Mäusen (Yanagisawa et al., 1998) und bei einem Patienten mit Mutation in ECE-1 beobachtet wurden (Hofstra et al., 1999). Ein GATA-Protein könnte identisch sein mit dem postulierten Transkriptionsfaktor, der - entweder kooperativ mit Nkx2-5 oder durch Nkx2-5 reguliert - an der Aktivierung der alternativen ECE-1 Promotoren in Kardiomyoblasten beteiligt ist (Funke-Kaiser et al., 2003c). GATA-1/-2/-3 sind zunächst ausschließlich im Rahmen verschiedener Aspekte der Hämatopoese als regulatorische Transkriptionsfaktoren beschrieben worden (Pandolfi et al., 1995; Simon, 1995; Charron et al., 1999). Als erstes nicht-erythroides Zielgen konnten Lee et al. 1991 für die ppET-1 mRNA-Expression GATA-2 als regulatives Element in endothelialen Zellen identifizieren. Zusammen mit der Tatsache, daß auch in den Promotoren von ECE-1a und -1b Konsensussequenzen für GATA vorliegen (Orzechowski et al., 1997), erscheint eine Beteiligung dieser Faktoren an der transkriptionellen Regulation der ECE-1c Isoform durch Bindung an die Konsensusstellen im ECE-1c Promotor möglich. Durch Koexpression von GATA-2 und dem ECE-1c Promotorkonstrukt -240 konnten Funke-Kaiser et al. (2003a) eine signifikante Zunahme der Promotoraktivität des Konstrukts -240 erreichen.

Der ECE-1c Promotor weist zwei Konsensussequenzen für Mitglieder der **ETS** Proteinfamilie an den Positionen –426 und –777 auf. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus einer Vielzahl von verwandten Proteinen, die sich durch eine konservierte Domäne von 85 Aminosäuren, die ETS Domäne, auszeichnen, welche das DNA-bindende Element darstellt (Janknecht und Nordheim, 1993; Crepieux et al., 1994). ETS-Transkriptionsfaktoren werden im humanen Embryo in den endothelialen Zellen der sich entwickelnden Gefäße, im adulten Organismus dagegen in den Kapillaren von Granulationsgewebe und im Stroma von Tumoren exprimiert, also in Situationen, die mit Vaskulogenese bzw. Angiogenese einhergehen (Wernert et al., 1992 und 1994; Iwasaka et al., 1996; Ito et al., 1998). Nach Verletzung der Arteria carotis mittels Ballonkatheter in Ratten kann ein Anstieg von Ets-1 Protein immunhistochemisch sowohl in den glatten Muskelzellen als auch in endothelialen Zellen nachgewiesen werden (Hultgardh-Nilsson et al., 1996; Tanaka et al., 1998). Die beobachtete Hochregulation von Ets-1 bei der Neointimabildung, bei der auch ECE-1 aufreguliert wird (Minamino et al., 1997), sowie die Tatsache, daß ET-1 in VSMC die Genexpression von Ets-1 aktiviert (Naito et al., 1998), machen eine Regulation von ECE-1 durch Ets-1 in pathologischen Situationen vorstellbar. Ein möglicher Mechanismus wurde von Orzechowski et al. (2001) aufgezeigt, die zeigen konnten, daß in humanen Endothelzellen durch Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) die signifikante Hochregulation der ECE-1a Isoform durch neusynthetisiertes Ets-1 Protein erfolgt. Allerdings weist der Promotor der Isoform 1a im Gegensatz zum ECE-1c Promotor multiple und teilweise evolutionär konservierte Konsensussequenzen für Ets-1 auf (Orzechowski et al., 1999), von denen ein innerhalb eines Tandem-Motivs lokalisiertes *cis*-Element für die Bindung von Ets-1 relevant ist (Orzechowski et al., 2001). In der gleichen Arbeit wurde eine signifikante Regulation von ECE-1c und ECE-1b/d durch PMA in Endothelzellen ausgeschlossen, so daß die ETS-Konsensussequenzen im c-spezifischen Promotor in Endothelzellen möglicherweise nicht funktional sind.

In der mehr distal gelegenen Promotorregion von ECE-1c wurden drei **Mikrosatelliten** identifiziert: zwei CA-Mikrosatelliten an den Positionen –507 bis

–542 und –797 bis –836 sowie ein CG-Satellit zwischen –543 und –564 (**Abb. 24**). Mikrosatelliten gehören zu der Familie von repetitiven, nicht-kodierenden DNA-Sequenzen, die aus Wiederholungen von 1 bis 6 Nukleotiden bestehen und etwa 3% des humanen Genoms ausmachen (Koreth et al., 1996; Subramanian et al., 2003). Dinukleotid-Wiederholungen sind dabei mit 0,5% am häufigsten und von diesen bilden mit 50% die CA-Satelliten die größte Gruppe, wohingegen CG-Wiederholungen selten sind und nur 0,1% aller Dinukleotid-Satelliten ausmachen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Im Hinblick auf ihre Länge sind CA-Wiederholungen hoch polymorph, und obwohl Mikrosatelliten im allgemeinen lediglich als neutrale DNA-Marker angesehen werden, wurde kürzlich ihre funktionelle Bedeutung in Bezug auf transkriptionelle Regulation nachgewiesen (Li et al., 2002). Als Beispiel für die pathophysiologische Bedeutung von polymorphen CA-Satelliten innerhalb von Promotoren sei das Matrix Metalloproteinase-9 Gen genannt, für das eine Assoziation von CA-Anzahl und Entwicklung einer diabetischen Nephropathie gezeigt werden konnte (Maeda et al., 2001). Ein weiteres Beispiel ist der CA-Polymorphismus im Promotor des *Insulin-like growth factor-I* Gens, für den eine Assoziation mit dem Auftreten eines Mammakarzinoms gefunden wurde (Yu et al., 2001). Funke-Kaiser et al. (2003a) konnten für alle drei Mikrosatelliten in der 5' Promotorregion von ECE-1c Längenpolymorphismen nachweisen, die einen signifikanten Effekt auf die Promotoraktivität sowohl in der humanen Endothelzelllinie EA.hy926 als auch in der neuronalen Zelllinie Kelly ausübten. Bedenkt man die Schlüsselrolle von ECE-1 im Rahmen der Endothelinbiosynthese, könnte diesem funktionellen Promotorpolymorphismus eine pathophysiologische Bedeutung bei der Ausprägung kardiovaskulärer und neurologischer Erkrankungen zukommen.

Das Promotorkonstrukt –968 des ECE-1c Promotors hat einen GC-Gehalt von 64% und das Verhältnis von beobachtetem zu erwartetem Auftreten von CpG beträgt 0,91 und erfüllt damit die von Gardiner-Garden und Frommer 1987 definierten Kriterien für das Vorliegen einer sogenannten **CpG-Insel**. Das humane Genom enthält etwa 29.000 dieser Inseln, und es wurde geschätzt, daß in Säugern annähernd die Hälfte der Promotoren proteinkodierender Gene CpG-Inseln enthalten, wobei diese

Promotoren häufig keine TATA-Box, DPE- oder Inr-Elemente aufweisen und durch multiple Transkriptionsstartpunkte gekennzeichnet sind (Smale und Kadonaga, 2003). Die genannten Charakteristika treffen alle auch auf den ECE-1c Promotor zu. Methylierung dieser Inseln innerhalb einer Promotorregion kann einerseits eine permanente Suppression des nachgeschalteten Gens zur Folge haben und wird bei der Inaktivierung des X-Chromosoms, Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgenen nachgewiesen (Engelmann et al., 1999; Toyota et al., 1999). Auch die regulatorische Region des ETB-Rezeptor-Gens enthält in Prostatakarzinomzelllinien und in den meisten Prostatakarzinomgeweben hypermethylierte CpG-Inseln. Die Gentranskription wird hierdurch inaktiviert (Nelson et al., 1997). Andererseits führt die Methylierung von CpG-Inseln, die 3' vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert sind, nicht unbedingt zum Block der Transkription, sondern kann im Gegenteil mit einer gesteigerten Expression des Gens korrelieren wie z.B. beim humanen Apolipoprotein-E (Larsen et al., 1993), so daß die Auswirkung einer Methylierung, bzw. ob überhaupt eine Methylierung erfolgt, abhängig ist von der Lokalisation der CpG-Insel zum Transkriptionsinitiationspunkt (Jones, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß der in dieser Arbeit identifizierte GC-Satellit in der Endothelzelllinie EA.hy926 *in vivo* unmethyliert vorliegt, daß aber durch *in vitro* Methylierung eine Abnahme der ECE-1c Promotoraktivität erreicht werden kann (Funke-Kaiser et al., 2003a). Hinsichtlich der Bedeutung von ECE-1 für die Gewebedifferenzierung in der Ontogenese könnte eine Regulation der ECE-1c Promotoraktivität durch Methylierung im sich entwickelnden Organismus eine Rolle spielen.

Insgesamt ist festzuhalten, daß der ECE-1c Promotor mehrere Charakteristika eines sogenannten *housekeeping*-Gens aufweist. Dazu zählen die ubiquitäre Gewebeexpression, Existenz multipler Transkriptionsstartpunkte, Nachweis der Funktionalität der Sp1-Bindungsstelle an Position -180, eine CAAT-Box in reverser Orientierung im proximalen ECE-1c Promotor bei fehlendem TATA-Element sowie ein hoher Gehalt an CG-Dinukleotiden (Schibler und Sierra, 1987; Ishimaru und Shipp, 1995; Smale und Kadonaga, 2003). Darüber hinaus ist die im Vergleich zu dem viralen SV40 Promotor auffällig starke Aktivität des ECE-1c Promotors sowohl

unabhängig vom Zelltyp als auch unabhängig von der Spezies (siehe 6.2.2 und 6.2.3).

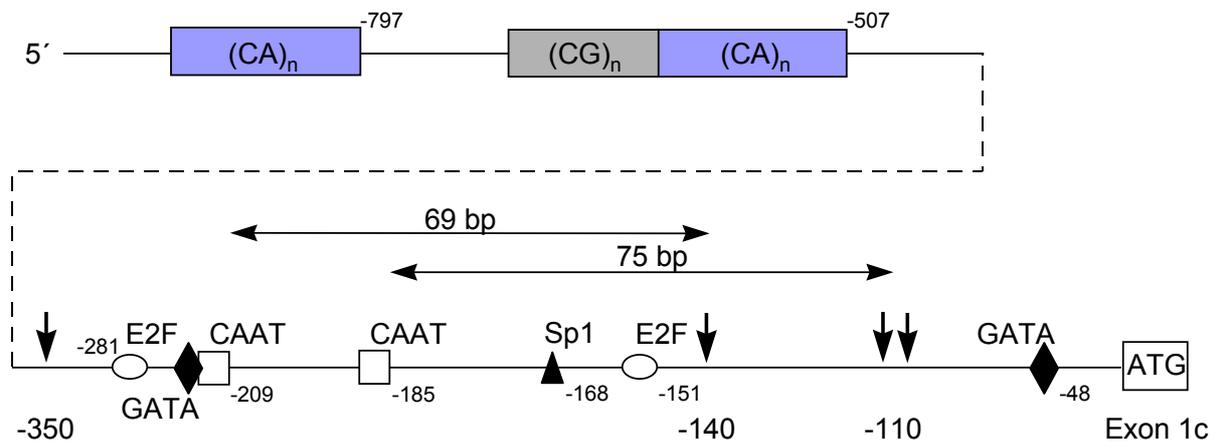


Abb. 24: Schematische Darstellung des humanen ECE-1c Promotors; geometrische Figuren: Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktorbindung, vertikale Pfeile: detektierte Transkriptionsstartpunkte, horizontale Doppelpfeile: Abstände zwischen CAAT-Boxen und detektierten Transkriptionsstartpunkten, farbige Kästen: identifizierte Mikrosatelliten in der distalen Promotorregion

7.2 Korrelation der Promotoraktivität mit den mRNA-Spiegeln

Ein Vergleich der unter 6.2.5 dargestellten Transfektionsergebnisse der isoformspezifischen ECE-1 Promotoraktivitäten (**Abb. 19**, **Abb. 20**) mit der Höhe der mittels RPA detektierbaren mRNA-Spiegel (siehe 6.3, **Abb. 21**) zeigt eine Korrelation zwischen Promotoraktivität und Transkriptionspiegel der Isoformen in zwei epithelialen Zelllinien (MCF7 und ECV304). MCF7 exprimieren ECE-1c mRNA; ECE-1a oder -1b mRNA sind jedoch nicht detektierbar. Entsprechend sind die Reporteraktivitäten der ECE-1a und -1b Promotorkonstrukte gegenüber der RLA für ECE-1c vernachlässigbar gering (siehe 6.2.5, **Abb. 19**). Dagegen lässt sich in ECV304-Zellen sowohl mRNA für ECE-1c als auch ECE-1b nachweisen. ECE-1a mRNA ist hier ebenfalls nicht zu detektieren, obwohl die Transfektion des ECE-1a Konstrukts in ECV304 eine signifikante RLA von 5% des ECE-1c Konstrukts zeigt (siehe 6.2.5, **Abb. 20**). Möglicherweise liegt die ECE-1a mRNA-Konzentration

unterhalb der Detektionsschwelle des RPA. Das relativ starke ECE-1b Signal im RPA im Vergleich zu der relativ geringen b-spezifischen Promotoraktivität von lediglich 7,8% läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß das protektierte Fragment von 264 Nukleotiden nicht nur ECE-1b, sondern auch ECE-1d repräsentiert. Außerdem besitzt die Methode der transienten Transfektion von Zellen, welche in dieser Arbeit als Grundlage für die basale Charakterisierung der Promotoraktivität der ECE-1c Isoform diente, bestimmte Limitationen.

7.2.1 Methodische Grenzen

Ein wesentlicher Aspekt besteht in der fehlenden Integration des Konstrukts in das Genom. Transient transfizierte Promotoren bilden zwar nukleosomale Strukturen aus (Archer et al., 1992; Jeong und Stein, 1994), sind aber nicht unbedingt den gleichen regulatorischen Mechanismen unterworfen, die in einer komplexen Chromatinstruktur integrierte Plasmide regulieren würden (Smith und Hager, 1997; Kornberg, 1999). Ein anschauliches Beispiel für die Bedeutung der Chromatinstruktur auf die Promotoraktivität einiger Gene ist der Promotor des *mouse mammary tumor virus* (MMTV). Lee und Archer untersuchten 1994 dessen Funktionalität sowohl mit einer transient transfizierten als auch einer genomisch stabil integrierten Matrize und fanden funktionelle Unterschiede in der Art der Interaktionen. Die Glukokortikoidrezeptor-vermittelte Transkriptionsaktivierung des stabil transfizierten Konstruktes war dabei zeitabhängig mit einem Höchstwert nach 60 min und Abfall auf basale Spiegel innerhalb von 24 h trotz kontinuierlicher Anwesenheit von Steroiden. Der beschriebene Rückgang korrelierte dabei mit einer Neuformation der reprimierenden Chromatinstruktur am Promotor. Im Gegensatz dazu war das transient transfizierte Promotorkonstrukt so lange aktiv, wie Glukokortikoide appliziert wurden (Archer et al., 1994; Lee und Archer, 1994). Die regulatorischen Mechanismen, die anhand von transient transfizierten Konstrukten erkannt wurden, sollten daher möglichst im Vergleich mit stabil integrierten Matrizen validiert werden, um potentielle Einflüsse der Chromatinstruktur auf die Aktivität des Promotors entweder aufdecken zu können oder diese auszuschließen. Schließlich muß darauf hingewiesen werden, daß Promotorkonstrukte immer nur mehr oder weniger

vollständige Fragmente der *in vivo* auf die Transkriptionsregulation eines Gens einflußnehmenden Sequenz repräsentieren und dadurch wichtige regulative Elemente nicht berücksichtigt werden, die 5' oder 3' des untersuchten Bereichs lokalisiert sind, wie *Enhancer* oder *Silencer*.

Wenn der detektierte mRNA-Spiegel nicht mit der Höhe der Promotoraktivität korreliert, kann außerdem eine unterschiedlich starke Degradation von endogenem Transkript und Reportergentranskript angenommen werden, zum Beispiel im Rahmen einer differentiellen posttranskriptionalen Prozessierung des 3'-Endes der mRNA, wodurch die Transkriptstabilität verändert werden kann (Ayoubi und van de Ven, 1996). In Analogie zum 5'-untranslatierten Bereich eines Gens finden sich auch am 3'-Ende des Transkriptes *cis*-Elemente, die von sequenzspezifischen mRNA-Bindungsproteinen erkannt werden und damit die mRNA-Stabilität kontrolliert regulieren können (Malter, 2001).

Schließlich sei angemerkt, daß sich Promotorfunktion in Abhängigkeit vom transfizierten Zelltyp sehr unterschiedlich darstellen kann, da regulatorische Transkriptionsfaktoren nicht unbedingt alle im untersuchten Zelltyp exprimiert werden bzw. nur in bestimmten Differenzierungszuständen oder pathophysiologischen Modellen aktiv sind. Das heißt, daß zur definitiven Klärung der Funktion von *cis*-Elementen in einem Promotor der Nachweis des regulatorischen Transkriptionsfaktors auf Proteinebene erfolgen muß. Ob das Transkriptionsfaktor-Protein tatsächlich innerhalb des Promotorkontextes funktionell sein kann, wird mittels Gelshiftanalysen weiter geklärt. Diese ermöglichen den Nachweis einer spezifischen Bindung zwischen definiertem Promotorfragment und Protein. Im Fall des ECE-1c Promotors wird der dargestellte Zusammenhang für das GATA-Element an Position -226, welches eine CAAT-Box überlappt, deutlich: Obwohl *in vitro* eine Transaktivierung des Promotors über GATA möglich ist, kann dies *in vivo* zumindest für EA.hy926 nicht von Bedeutung sein, da diese Zelllinie GATA-2 Protein nicht exprimiert (Funke-Kaiser et al., 2003a).

7.3 Bedeutung der Expression von ECE-1 Isoformen für die subzelluläre

Lokalisation

Alle vier isoformspezifischen ECE-1 Exone enthalten jeweils ein putatives Translationsinitiationskodon, so daß sich die resultierenden Proteinisoformen nur im N-Terminus voneinander unterscheiden, wofür die beobachtete unterschiedliche subzelluläre Distribution spricht. Bei Untersuchungen an stabil transfizierten heterologen CHO-Zellen wurden humanes ECE-1c wie auch ECE-1d sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytoplasma detektiert (Schweizer et al., 1997). In der Arbeit von Muller et al. (2003) an stabil transfizierten neuroendokrinen AtT-20 Zellen wurde für ECE-1d nur ein schwaches Signal in der Plasmamembran detektiert und als Hauptlokalisierung dieser Isoform intrazelluläre Kompartimente nachgewiesen. Humanes ECE-1a ist nahezu ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert, bovines ECE-1a findet sich dagegen intrazellulär (Schweizer et al., 1997; Russell et al., 1998; Valdenaire et al., 1999b; Muller et al., 2003). Humanes ECE-1b scheint nur intrazellulär lokalisiert zu sein (Schweizer et al., 1997; Azarani et al., 1998), wohingegen das bovine ECE-1b an der Zelloberfläche detektiert wird (Emoto et al., 1999).

Für die Zuweisung von transmembranalen Proteinen zu bestimmten intrazellulären Kompartimenten spielen v.a. zwei Signale eine Rolle: das N-terminale YXXZ-Motiv (Y ist dabei Tyrosin, X steht für eine beliebige Aminosäure und Z ist eine der hydrophoben Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin, Cystein oder Alanin) sowie das LZ-Motiv (Letourneur und Klausner, 1992; Sandoval und Bakke, 1994). Durch beide Signale werden die Internalisierung von der Plasmamembran und die Zuweisung zu endosomalen Kompartimenten vermittelt. Mutationen im YXXZ-Motiv können zu einer Kumulation des betroffenen Proteins an der Zelloberfläche führen. Die einzelnen ECE-1 Isoformen zeichnen sich durch Unterschiede in ihrer N-terminalen Sequenz aus. Durch diese wiederum lassen sich die differenten subzellulären Lokalisationen wie folgt erklären: Die humane ECE-1b Isoform, die sich in 17 Aminosäuren am N-Terminus von ECE-1c unterscheidet, liegt offenbar strikt intrazellulär vor (Schweizer et al., 1997; Azarani et al., 1998). Die Arbeitsgruppen

Cailler et al. und Valdenaire et al. konnten nachweisen, daß hierfür zwei LZ-Motive im N-Terminus verantwortlich sind (Cailler et al., 1999; Valdenaire et al., 1999b). ECE-1c enthält dagegen nur ein LZ-Motiv, was für die intermediäre Lokalisation dieser Isoform verantwortlich sein könnte (Valdenaire et al., 1999b). Durch welche Mechanismen das humane ECE-1a, welches ebenfalls ein LZ-Motiv aufweist (Turner et al., 1998), hauptsächlich in der Zellmembran lokalisiert ist, bleibt ebenso unklar wie die Beobachtung der Phosphoramidon-induzierten Internalisierung dieser Isoform durch Barnes et al. 1996. Möglicherweise spielt hier der Abstand des LZ-Motives zum N-Terminus eine Rolle. So weist das bovine, intrazellulär lokalisierte ECE-1a ein LZ-Motiv auf, welches im Gegensatz zur humanen Sequenz näher am N-Terminus positioniert ist (Turner et al., 1998). In der Arbeit von Muller et al. (2003) konnte humanes ECE-1d wie ECE-1b im wesentlichen intrazellulär nachgewiesen werden. Ein VL-Motiv im N-Terminus soll dafür verantwortlich sein. Zur Verdeutlichung der dargestellten Zusammenhänge sei auf **Tabelle 5** verwiesen.

Isoform	N-terminale Aminosäuresequenz	subzelluläre Lokalisation	Referenz
ECE-1a human	MPLQGLGLQRNPFLQGKRGPGLTSSPPLLPPS <u>LQVN</u>	Plasmamembran	Turner et al., 1998
ECE-1a bovin	---SPR-QD--L--S-LLL--SEA-----FR----- <u>LQVN</u>	intrazellulär	Turner et al., 1998
ECE-1b human	MRGVWPPPVSALLSALGM <u>STYKRATLDEEDLVDSL</u>	intrazellulär	Cailler et al., 1999; Valdenaire et al., 1999
ECE-1c human	<u>MMSTYKRATLDEEDLVDSL</u>	intermediär	Valdenaire et al., 1999
ECE-1d human	MEALRES <u>VLHLALQMSTYKRATLDEEDLVDSL</u>	intrazellulär	Muller et al., 2003

Tab. 5: N-terminale Aminosäuresequenzen der ECE-1 Isoformen; Fettgedrucktes: mögliche Motive für die subzelluläre Lokalisation, --: identische Aminosäuren, Unterstreichung: Exon-kodierte Aminosäuren

Alle vier ECE-1 Isoformen bilden über eine Disulfidbrücke in ihrem extrazellulären Anteil Dimere aus (Shimada et al., 1996). Darüber hinaus konnte jetzt gezeigt werden, daß auch die Formation von Heterodimeren, d.h. Dimerbildung zwischen zwei verschiedenen Isoformen, möglich ist (Muller et al., 2003). In Zellen, welche ECE-1a und ECE-1b koexprimieren, führt diese Heterodimerbildung zu intrazellulärer Retention von ECE-1a und Abnahme der extrazellulären Aktivität, gemessen an der Fähigkeit, exogen zugeführtes big ET-1 in ET-1 zu konvertieren (Muller et al., 2003). Dies könnte bedeuten, daß die Kontrolle der isoformspezifischen Genexpression über die Heterodimerisation eine direkte Bedeutung für die extrazelluläre Aktivität von ECE-1 in Abhängigkeit von der Art und Menge der exprimierten Isoformen hat.

7.4 Therapeutische Implikationen

Auf das therapeutische Potential einer ECE-1 Inhibition verweisen verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen: In einem Modell für Herzversagen beim Hund führte die zweimalige Bolusgabe des ECE-Inhibitors FR901533 innerhalb von 60 min zu einer signifikanten Senkung des pulmokapillären Verschußdrucks, Hemmung des aktivierten Renin-Angiotensin-Systems, Zunahme des renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate mit Steigerung des Urinvolumens sowie der Natriumexkretionsrate (Wada et al., 1999). Bei der Ratte führte die subkutane Applikation von FR901533 über sieben Tage nach ausgedehntem Myokardinfarkt zu einer Verbesserung hämodynamischer Parameter. Zusätzlich wurde die Myofibroblastenaktivierung in der Infarktzone reduziert (Martin et al., 2000). Gabe des ECE-Inhibitors RO0687629 führte in fulminant hypertensiven transgenen Ratten zu einer Senkung der Mortalität um mehr als 50% (Muller et al., 2002). Bei Mäusen, die aufgrund einer *Trypanosoma cruzi* Infektion eine akute Myokarditis bzw. eine chronische Kardiomyopathie entwickelten, konnte mittels Phosphoramidon die Mortalität in der akuten Phase gesenkt sowie die strukturellen und funktionellen Veränderungen der chronischen Infektion reduziert werden (Jelicks et al., 2002). Tikkanen et al. (2002) konnten durch den kombinierten NEP/ECE-Inhibitor CGS 26303 den mittleren arteriellen Blutdruck und die Albuminurie bei diabetischen Ratten reduzieren. Darüber hinaus konnte CGS 26303 den durch eine Subarachnoidalblutung bei Kaninchen ausgelösten Vasospasmus signifikant reduzieren (Caner et al., 1996; Kwan et al., 1997). Die Beeinträchtigung der hepatischen Mikrozirkulation bei Ratten, gemessen anhand der sinusoidalen Perfusionsrate und dem sinusoidalen Durchmesser sowie dem Durchmesser der postsinusoidalen Venolen und des lokalen Gewebe-pO₂ in Ischämie/Reperfusionsexperimenten durch Abbinden des Ligamentum hepatoduodenale, wurde durch die Applikation von FR901533 ebenfalls vermindert (Uhlmann et al., 2001).

Es gibt erste Arbeiten, die auf eine isoformspezifische Beteiligung von ECE-1 bei Erkrankungen des Menschen hindeuten. Rossi et al. zeigten 1999 eine Assoziation von erhöhten ECE-1a und ET-1 Spiegeln mit morphologischen und funktionellen Veränderungen in arteriosklerotisch veränderten humanen Arterien. Eine Hochregulation von ECE-1a wurde auch bei der ischämischen Kardiomyopathie nachgewiesen (Ergul et al., 2000). Dagegen fand sich bei der dilatativen Kardiomyopathie keine mRNA-Expressionsänderung der Isoformen ECE-1a und ECE-1b/c (Zolk et al., 1999).

Neben Metallchelatoren, peptidischen Inhibitoren und natürlichen Produkten wird vor allem Phosphoramidon - ein Inhibitor von ECE-1 und NEP - als ECE-Hemmer eingesetzt. Dessen Struktur wurde in den letzten Jahren chemisch modifiziert, um die Spezifität und Aktivität gegenüber ECE-1 zu erhöhen (Löffler, 2000). Im Hinblick auf die unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen der Isoformen kommt dabei der Membranpermeabilität der bisher synthetisierten, spezifischen ECE-1 Inhibitoren eine zentrale Bedeutung für eine effiziente Hemmung der Enzymaktivität zu. So ist bekannt, daß Phosphoramidon unterschiedliche inhibitorische Effekte auf die Konversion von exogenem und endogenem big ET-1 ausübt, wobei die Konversion von exogenem big ET-1 deutlich besser inhibiert wird (Parnot et al., 1997). Dies steht im Einklang mit der Tatsache, daß Phosphoramidon lediglich in geringem Maß in das Zellinnere gelangt (Corder et al., 1993). Ein Einfluß der Isoformen selbst auf die Hemmung der Enzymaktivität ist nicht zu erwarten, da isoformspezifisch lediglich der N-Terminus variiert und das katalytische Zentrum von diesem weit entfernt ist. In der Arbeit von Isaka et al. wurde der Effekt von Phosphoramidon auf die Proteinexpression der Isoformen ECE-1a, -1b und -1c untersucht. Die Applikation des Inhibitors zu jeweils stabil mit ECE-1a, -1b oder -1c transfizierten CHO-Zellen zeigte eine Zunahme der intrazellulären Proteinspiegel von ECE-1a und -1b, wohingegen die Expression von ECE-1c unverändert blieb. Die mRNA-Spiegel blieben dabei konstant, dagegen führte Phosphoramidon zu einer Verlängerung der Protein-Halbwertszeit von zwei auf vier Stunden für ECE-1a sowie von vier auf über acht Stunden für ECE-1b (Isaka et al., 2003). Die beobachteten Effekte von Phosphoramidon auf den Proteinumsatz von ECE-1 sind wahrscheinlich

substanzspezifisch und unabhängig von der Enzymhemmung. Ähnliche Effekte mit strukturell unterschiedlichen Inhibitoren wurden nicht gezeigt.

Trotz des eindeutigen therapeutischen Potentials von ECE-1 Inhibitoren wird erst eine profundere Kenntnis über die differenzielle Beteiligung der unterschiedlichen Isoformen von ECE-1 an bestimmten pathophysiologischen Zusammenhängen sowie ihre präzise subzelluläre Lokalisation die Entwicklung effizienter Inhibitoren ermöglichen und die Effekte einer differenzierten Blockade des Enzyms bei bestimmten Erkrankungen klären können.