

5 Diskussion

5.1 Einleitende Bemerkungen

Eine Interaktion zwischen dem Endothelinsystem, insbesondere dem Endothelinkonvertierungsenzym-1 (ECE-1), und dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5 ist bisher noch nicht beschrieben worden. Die essentielle Rolle der beiden Gene in der Herzentwicklung, die Beeinflussung - zumindest partiell – der gleichen Zielgene in den Knock-out-Modellen und die Ähnlichkeit der kardialen Fehlbildungen sowohl bei den Knock-out-Modellen als auch bei Patienten mit Mutationen in einem der beiden Gene lassen jedoch eine Interaktion zwischen beiden Genen in der kardialen Entwicklung vermuten.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es erstmals eine Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5 und dem ECE-1 nachzuweisen. Gleichzeitig konnte als möglicher Hinweis auf einen neuen Mechanismus der transkriptionellen Kontrolle erstmals auch nachgewiesen werden, daß ein einzelner Transkriptionsfaktor (Nkx2.5) in der Lage ist, gleichzeitig alternative Promotoren desselben Gens zu aktivieren (ECE-1b und ECE-1c) und zu reprimieren (ECE-1a). Diese Befunde sind vor dem Hintergrund der Bedeutung des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 und des Endothelinsystems für die regelrechte Entwicklung der Herzanlage, der Mißbildungen bei Ausfall einer dieser Komponenten und der pathophysiologischen Veränderungen bei der erworbenen Herzerkrankung des Erwachsenen zu diskutieren. So sollen im folgenden zunächst ein Überblick über die Bedeutung von Nkx2.5 und ECE-1 in der Kardiogenese und über die dieser Dissertation zugrundeliegenden Ergebnisse gegeben werden, die letztlich zu der Hypothese führen, daß die konotrunkalen Herzfehler bei Patienten mit einer Mutation im Gen für Nkx2.5 das Ergebnis einer Dysregulation der isoformspezifischen ECE-1-Expression sein könnten.

5.2 Die Bedeutung von ECE-1 und Nkx2.5 für die Herzentwicklung

Sowohl das Endothelinsystem als auch der Transkriptionsfaktor Nkx2.5 sind essentielle Faktoren für die regelrechte Entwicklung des Herzens. Nkx2.5 wird als einer der frühesten Marker der kardialen Differenzierung (Lints et al. 1993; Komuro et al. 1993; Shiojima et al. 1996) bereits vor den spezifischen Herzmuskelgenen in kardialen Vorläuferzellen exprimiert. Seine Expression begrenzt die herzbildende Region nach medial und lateral und die Ablation dieser Region in Hühnerembryonen führt zu einem Verlust der Herzstrukturen (Ehrmann und Yutzey 1999), während das anteriore Endoderm via BMP (bone morphogenic protein) die Expression von Nkx2.5 im Mesoderm zu induzieren scheint (Schultheiss et al. 1995; Ehrmann und Yutzey 1999). Das vollständige Fehlen von Nkx2.5 führt zu einem Stillstand der kardialen Entwicklung vor (Lyons et al. 1995) bzw. unmittelbar nach dem Looping (Tanaka et al. 1999), zu einem Fehlen der Endokardkissenanlage (Tanaka et al. 1999) und zu einer Veränderung der Genexpression innerhalb des Herzmuskels. Die Expression des Myosin light chain 2v-Gens (MLC2v), dem frühesten Marker der ventrikulären Differenzierung, ist durch das Fehlen des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 runterreguliert (Tanaka et al. 1999) oder sogar gar nicht mehr nachzuweisen (Lyons et al. 1995). Eine Expression des basic Helix-loop-helix-Faktors (bHLH) eHAND, der vor dem Looping charakteristischer Weise linksseitig im linearen Herzschauch exprimiert wird und einen Teil der intrinsischen Antwort auf ein Links/rechts-axiales System darstellt, ist in seinem typischen Expressionsmuster nicht mehr nachzuweisen (Biben und Harvey 1997). Auch die Expression des atrionatriuretischen Faktors (ANF) und des B-Typ natriuretischen Peptids (BNP) scheint im Ventrikel, nicht jedoch auf Vorhofebene, von Nkx2.5 reguliert zu werden (Tanaka et al. 1999).

Der Nachweis von heterozygoten Mutationen auf Chromosom 5q35 – in der Nähe des Nkx2.5-Gens, das an der Grenze von 5q34 zu 5q35 lokalisiert ist (Shiojima et al. 1995) – bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern und atrioventrikulären Überleitungsstörungen (Schott et al. 1998; Benson et al.

1999; Zhu et al. 2000; Kasahara et al. 2000) sowie der Nachweis entsprechender, wenn auch milderer Veränderungen (nur moderate Veränderungen im inter atrialen Septum und geringgradige Verlängerungen des PQ-Intervalles im EKG) bei Mäusen mit einer heterozygoten Nkx2.5-Nullmutation (Biben et al. 2000) unterstreichen die Bedeutung von Nkx2.5 innerhalb der Kardiogenese und weisen auf eine Bedeutung von Nkx2.5 in unterschiedlichen Stadien der Herzbildung hin. Mindestens ein funktionelles Allel scheint für das kardiale Looping in einem frühen Stadium der Entwicklung notwendig zu sein, während in späteren Stadien v.a. in der humanen Entwicklung beide funktionellen Allele für die Kontrolle des genetischen Programmes, das u.a. die regelrechte Ausbildung der atrialen, ventrikulären und konotrunkalen Septierung sowie der AV-Klappen veranlaßt, benötigt werden.

Die Bedeutung der verschiedenen Komponenten des Endothelinsystems für die Herzentwicklung ist durch die Knock-out-Modelle für ET-1, ET_A-Rezeptor und ECE-1 nachgewiesen worden. Mäuse mit einer homozygoten Nullmutation für das Endothelin-1-Gen zeigen neben kraniofazialen Fehlbildungen Anomalien des Aortenbogens und der großen Gefäße sowie Ventrikelseptumdefekte (VSD). Eine Störung in der regelrechten Ausbildung der Kiemenbogenarterien und der Endokardkissen ist in diesem Knock-out-Modell schon in frühen embryonalen Stadien gezeigt worden (Kurihara et al. 1994; Kurihara et al. 1995). Wie im Nkx2.5-Knock-out-Modell ist auch bei den Mäusen mit einer homozygoten Nullmutation für ET-1 die Expression weiterer für die kardiale Entwicklung wichtiger Gene beeinträchtigt. So konnten Thomas et al. (1998) zeigen, daß bei ET-1^{-/-} Mäusen die Expression der bHLH-Faktoren dHAND und eHAND in den Kiemen- und Aortenbögen herunterreguliert ist. Mäuse, bei denen das ET_A-Rezeptor-Gen ausgeschaltet wurde, zeigen die Charakteristika des humanen CATCH-22-Syndroms (cardiac defects, abnormal facies, thymic hypoplasia, cleft palate, hypocalcaemia + Chromosom 22 Mikrodeletion) (Clouthier et al. 1998), während Mäuse mit einer homozygoten Nullmutation für ECE-1 zusätzlich zu den kardiovaskulären Anomalien des ET-1-/ET_A-Rezeptor-

Knock-outs ein aganglionies Megakolon und Pigmentierungsstörungen, wie man sie im ET-3-/ET_B-Rezeptor-Knockout-Modell findet, aufweisen (Yanagisawa et al. 1998). Eine zusätzliche Ausschaltung des ECE-2-Gens, d.h. ein ECE-1-/ECE-2-Doppel-Knockout, führt zu gravierenderen kardialen Fehlbildungen im Bereich des Ausflußtraktes und zusätzlich zu Anomalien im Bereich der AV-Klappen (Yanagisawa et al. 2000), die im ECE-1-Knockout nicht beobachtet werden. Diese Befunde und die Tatsache, daß der ECE-2-Knockout alleine keine kardialen Fehlbildungen verursacht zeigen eine zumindest partielle Redundanz zwischen diesen beiden ECEs.

Die klinische Relevanz des ECE-1 unterstreicht der Nachweis einer inaktivierenden heterozygoten Mutation im ECE-1-Gen auf Chromosom 1p36 (Hofstra et al. 1999) bei einem Patienten, der eine Vielzahl der oben beschriebenen Fehlbildungen aufweist. Bei dem „Vergleich“ der Knock-out-Modelle und dem Nachweis von Mutationen beim Menschen müssen jedoch mögliche Speziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch bedacht werden.

5.3 Koexpression von ECE-1 und Nkx2.5: Voraussetzung einer möglichen Interaktion

5.3.1 Koexpression in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2

Als Voraussetzung für eine mögliche Interaktion wurde zunächst die Koexpression des ECE-1 und des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 in einer Kardiomyoblastenzelllinie (H9c2) untersucht, da es über die Expression des ECE-1 in Kardiomyozyten in der Literatur z.T. widersprüchliche Angaben gibt. Einige Arbeitsgruppen beschreiben eine Expression von ECE-1 in Kardiomyozyten (Xu et al. 1994; Ergul et al. 2000), während andere eine Expression in diesen Zellen nicht nachweisen konnten (Korth et al. 1999). Die Expression von Nkx2.5 in Kardiomyozyten in vivo wurde bereits für das embryonale, das fetale und das adulte Herz gezeigt (Lints et al. 1993; Komuro und Izumo 1993; Shiojima et al. 1996), und in der vorliegenden Arbeit auch in den H9c2-Zellen nachgewiesen. Die Expression des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene (s. Abschnitt

4.1.1.; 4.3) und die ECE-1-Expression auf mRNA-Ebene (s. Abschnitt 4.1.3., 4.2.2) in der Kardiomyoblastenzelllinie nachgewiesen werden. Mit dem Nachweis der Koexpression ist auch die Voraussetzung für eine mögliche Interaktion in der kardialen Entwicklung und im Zusammenhang mit anderen pathophysiologischen Vorgängen im Bereich des Herzens gegeben.

5.3.2 Koexpression in der embryonalen Herzanlage der Ratte

Da nicht nur die räumliche, sondern auch die zeitliche Koexpression eine Voraussetzung für eine Interaktion darstellt, wurde in der hier vorliegenden Arbeit auch die Expression des ECE-1 und des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 in der embryonalen Herzentwicklung der Ratte untersucht. Desweiteren wurde hier erstmals die isoformspezifische ECE-1-Expression im „kritischen“ Stadium der Herzentwicklung untersucht. Bisherige Arbeiten (Brand et al. 1998) bezogen sich nur auf die Expression von ECE-1 „gesamt“, d.h. ohne eine genaue Betrachtung der einzelnen Isoformen. In den untersuchten embryonalen Rattenherzanlagen konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten (s. Tab. 4.1) sowohl Nkx2.5 als auch die ECE-1-Isoformen ECE-1a, -1b und -1c auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden.

5.3.3 Kardiale Koexpression bei Patienten mit kongenitalen Herzfehlern

Ziel dieser Teiluntersuchung war es, die isoformspezifische ECE-1-Expression bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern darzustellen und gegebenenfalls eine gegenüber gesunden fetalen und adulten Herzen veränderte isoformspezifische ECE-1-Expression nachzuweisen. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine gegebenenfalls veränderte ECE-1-Expression mit einer Veränderung in der Nkx2.5-Expression einhergeht und ob Unterschiede im Expressionsmuster von Nkx2.5 und ECE-1 zwischen Vorhof und Kammer existieren.

In der Untersuchung der isoformspezifischen Expression des ECE-1 in Gewebeproben von Patienten mit angeborenen, meist konotrunkalen

Herzfehlern (s. Tabelle 4.2), wie sie in den Knock-out-Modellen und vereinzelt bei Patienten mit Mutationen in einem der beiden Gene beschrieben sind, konnte sowohl im Vergleich von Vorhof- zu Ventrikelproben eines Patienten als auch im Vergleich zu gesunden fetalen und adulten Herzen keine offensichtlichen Veränderung des Expressionsmusters – sowohl für die ECE-1-Isoformen als auch für Nkx2.5 - nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.1.3, 4.2.2). D.h. es kommt entweder im Rahmen von Herzfehlbildungen tatsächlich zu keiner Veränderung der isofomspezifischen ECE-1-Expression bzw. der Nkx2.5-Expression oder die RT/PCR ist eine so sensitive Methode, daß eine Veränderung der Expression z.B. in Kardiomyozyten im „Background“, z.B. generiert durch die auch in den Proben enthaltenen Endothelzellen, untergeht. Eine weitere mögliche Erklärung ist eventuell dadurch begründet, daß zwischen der kardialen Entwicklung und dem jetzt vorliegenden Herzfehler eine (je nach Alter des Patienten) nicht unbeträchtliche Zeitspanne liegt. So könnte es durchaus sein, daß die Analyse der isoformspezifischen ECE-1-Expression bei den untersuchten Patienten viel zu spät erfolgt. Streng genommen müßte man die Expression während der kardialen „Fehl“-Entwicklung untersuchen, um eine verlässliche Aussage über die Isoformexpression in dieser Phase zu machen. Möglicherweise kommt es während der Herzentwicklung zu einem temporären unphysiologischen Isoformshift, der sich zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisen läßt.

5.4 Funktionelle Interaktion von ECE-1 und Nkx2.5 in vitro

Mit den hier durchgeführten Versuchen an der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2 konnte erstmals in vitro eine funktionelle Interaktion zwischen Nkx2.5 und dem Endothelin-Konvertierungsenzym-1 nachgewiesen werden. Nkx2.5 scheint die alternativen ECE-Promotoren in dieser Zelllinie differentiell zu regulieren.

Die Koexpression von Nkx2.5 führt zu einer Repression der Aktivität des ECE-1a-Promotors und zu einer Aktivierung des ECE-1b- und ECE-1c-Promotors.

Die Interaktion mit den alternativen Promotoren des ECE-1 scheint jedoch über direkte bzw. indirekte Mechanismen abzulaufen, was im folgenden diskutiert werden soll.

Die hier vorgelegten Ergebnisse der Transfektions-/Koexpressionsexperimente weisen darauf hin, daß die Unterdrückung des ECE-1a-Promotors durch Nkx2.5 *nicht* über eine direkte Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor und der Nkx2.5-Konsensussequenz im ECE-1a-Promotor vermittelt wird. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf einen indirekt vermittelten Mechanismus hin: Die Einführung inaktivierender Punktmutationen in die Nkx2.5-Konsensussequenz führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der Reporterogenaktivität. Desweiteren ist der repressive Effekt von Nkx2.5 unter Ko-Überexpressionsbedingungen auf den ECE-1a-Promotor trotz funktioneller Inaktivierung der Nkx2.5-Konsensussequenz noch signifikant. Auch im EMSA kann weder mit den Kernextrakten aus H9c2-Zellen noch mit rekombinantem Nkx2.5-Protein eine Protein-DNA-Interaktion zwischen Nkx2.5 und seiner Konsensussequenz im ECE-1a-Promotor nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.5.1). Für diese Ergebnisse gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder das endogene Expressionsniveau von Nkx2.5 reicht für eine Alteration der ECE-1a-Promotorfunktion nicht aus, oder als Ursache der Repression der ECE-1a-Promotor-Funktion in den Koexpressionsexperimenten muß eine indirekt vermittelte Interaktion angenommen werden. Die indirekte Interaktion könnte entweder durch Aktivierung eines noch nicht identifizierten Repressor, der mit ECE-1a-Promotor interagiert, oder durch Repression eines - ebenfalls noch unbekannt - transkriptionellen Aktivators des ECE-1a durch Nkx2.5 vermittelt werden.

Im Gegensatz zu den indirekt-repressiven Einflüssen auf den ECE-1a-Promotor zeigen die hier dargestellten Ergebnisse der *in vitro*-Experimente eine direkte Aktivierung des ECE-1b-Promotors durch den Transkriptionsfaktor Nkx2.5. Die funktionelle Inaktivierung der Nkx2.5-Konsensussequenz innerhalb des ECE-1b-Promotor-Reporter-Konstruktes durch Mutagenese führt hier zu einer signifikanten Reduzierung der Luziferaseaktivität. Einen weiteren Hinweis für

eine direkte Interaktion ergibt sich aus den Ergebnissen der Koexpressionsexperimente mit einer Deletionsmutante des ECE-1b-Promotors, dem die Nkx2.5-Konsensussequenz fehlt. Die Koexpression mit Nkx2.5 führt hier nicht zu einer Aktivierung der Promotoraktivität und unterstreicht somit die funktionelle Bedeutung der Nkx2.5-Konsensussequenz. Die direkte Interaktion zwischen Nkx2.5 und dem ECE-1b-Promotor spricht für ein ausreichendes Expressionsniveau von Nkx2.5 und unterstützt somit die These einer indirekten Interaktion mit dem ECE-1a-Promotor. Mittels EMSA-Analyse konnte die direkte Interaktion zwischen rekombinantem Nkx2.5-Protein und der Nkx2.5-Konsensussequenz innerhalb des ECE-1b-Promotors gezeigt werden (s. Abschnitt 4.5.1). Der EMSA mit Kernextrakten zeigt lediglich, daß ein nukleäres Protein (wahrscheinlich Nkx2.5) an die DNA-Sequenz bindet. Die drei geschifteten Banden, die in den Versuchen mit den Kernproteinen zu beobachten sind (s. Abb. 4.18), sind am wahrscheinlichsten auf die Bindung der drei verschiedenen, in der Literatur für das menschliche Herz beschriebenen (Shiojima et al. 1996) Nkx2.5-Protein-Isoformen zurückzuführen. Die obere Bande ist nicht vollständig kompetierbar, so daß hier möglicherweise eine unspezifische DNA-Protein-Interaktion vorliegt.

Neben der Repression des ECE-1a- und der Aktivierung des ECE-1b-Promotors wurde in den Koexpressionsexperimenten auch eine Aktivierung des ECE-1c-Promotors beobachtet. Da die Sequenz-Analyse des ECE-1c-Promotors weder Konsensussequenzen für Nkx2.5 (noch für weitere Proteine der Nkx-Proteinfamilie) ergeben hat, ist diese Aktivierung möglicherweise auf einen indirekten Mechanismus zurückzuführen, auch wenn die Bindung von Nkx2.5 an eine bislang unbekannte Sequenz nicht ausgeschlossen werden kann.

Vor dem Hintergrund der in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen von Nkx2.5 mit anderen Genen scheint die hier gefundene indirekt repressive Funktion auf den ECE-1a-Promotor am bemerkenswertesten zu sein, da hemmende Wirkungen von Nkx2.5 bis jetzt kaum beschrieben wurden. Die Analyse der Genexpression in Nkx2.5-Knock-out-Mäusen hat bis jetzt nur bei

zwei Genen, die beide ebenfalls für Transkriptionsfaktoren kodieren, eine, zumindest partielle, negative Regulation durch Nkx2.5 nachweisen können. Tanaka et al. (1999) konnten im Ventrikel von Mäusen mit einer homozygoten Nullmutation für Nkx2.5 mittels In-situ-Hybridisierung eine Hochregulierung des Homeobox-Transkriptionsfaktor Msx2, dem eine Beteiligung an der Endokardkissenbildung zugeschrieben wird, nachweisen (im Sinne einer „diffuseren“ Expression im gesamten Ventrikel). Im „gesunden“ Herzen dagegen beschränkt sich die Msx2-Expression weitgehend auf die Strukturen des AV-Kanals. Für das bHLH-Protein eHAND konnte bei der Nkx2.5-Knock-out-Maus – ebenfalls mittels In-situ-Hybridisierung - eine ektopische Expression im kaudalen, der Herzanlage benachbarten, pharyngealen Endoderm (Biben und Harvey 1997) nachgewiesen werden. So scheint Nkx2.5 in vivo die Msx2-Expression im Ventrikel und die eHAND-Expression in einem Teil des pharyngealen Endoderms und ECE-1a-Aktivität – zumindest in vitro – in Kardiomyoblasten negativ zu regulieren.

5.5 Funktionelle Interaktion von ECE-1 und Nkx2.5 in vivo?

Weitere Hinweise auf eine Interaktion zwischen Nkx2.5 und ECE-1 ergeben sich auch aus den hier vorliegenden Untersuchungen zum endogenen Expressionmuster dieser Gene in H9c2-Zellen, in den embryonalen Rattenherzen und den humanen Herzgewebeproben. ECE-1b und -1c-Transkripte konnten mit einem isoformspezifischen RPA sowohl in den H9c2-Zellen als auch in humanen Gewebeproben sicher nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.2), während der Nachweis von ECE-1a-mRNA, als Hinweis auf eine wesentlich schwächere Expression dieser Isoform, in beiden Fällen nur mit RT-PCR gelang (s. Abschnitt 4.1.1, 4.1.3). Dieses isoformspezifische Expressionsprofil kann zumindest teilweise durch die Wirkung des endogenen Nkx2.5 auf die drei alternativen ECE-1-Promotoren erklärt werden, die in einer

transkriptionellen Aktivierung von ECE-1b und ECE-1c und der Repression des ECE-1a resultiert.

Somit sind die Ergebnisse der hier vorgelegten funktionellen Promotoranalyse und der Analyse der endogenen mRNA-Expression sowohl in H9c2-Zellen als auch im Herzgewebe übereinstimmend und sind als Hinweis auf eine differentielle Regulation der alternativen ECE-1-Promotoren auch im Chromatinkontext zu werten. (Abb. 5.1)

Im Kontext der in der Literatur veröffentlichten Daten zur Expression von Nkx2.5 und ECE-1 im Herzen unterstützen die hier präsentierten Daten die Hypothese, daß Nkx2.5 auch in vivo die myokardiale ECE-1-Expression regulieren und als transkriptioneller Regulator von ECE-1 entwicklungsbiologisch relevant sein könnte. Bereits die Existenz alternativer Promotoren im ECE-1-Gen weisen auf eine entwicklungsbiologische Relevanz dieses Enzyms hin.

Im allgemeinen sind alternative Promotoren für eine zell- und entwicklungsstadiumspezifische Genexpression, für die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation und die unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen der Isoformen verantwortlich (Ayoubi und Van De Ven 1996; Schibler und Sierra 1987). So wird ECE-1a v.a. an der Zelloberfläche exprimiert, während ECE-1b eine intrazelluläre und ECE-1c eine intermediäre Lokalisation aufweisen (Schweizer et al. 1997; Valdenaire et al. 1999a; Valdenaire et al. 1999b). Eine mögliche Bedeutung der differentiellen Regulation der alternativen ECE-1-Promotoren durch Nkx2.5 könnte in einer Verschiebung des Verhältnisses von intra- zu extrazellulärem ECE-1 und den möglichen Auswirkungen auf die endokrine bzw. parakrine Sekretion von ET-1 liegen.

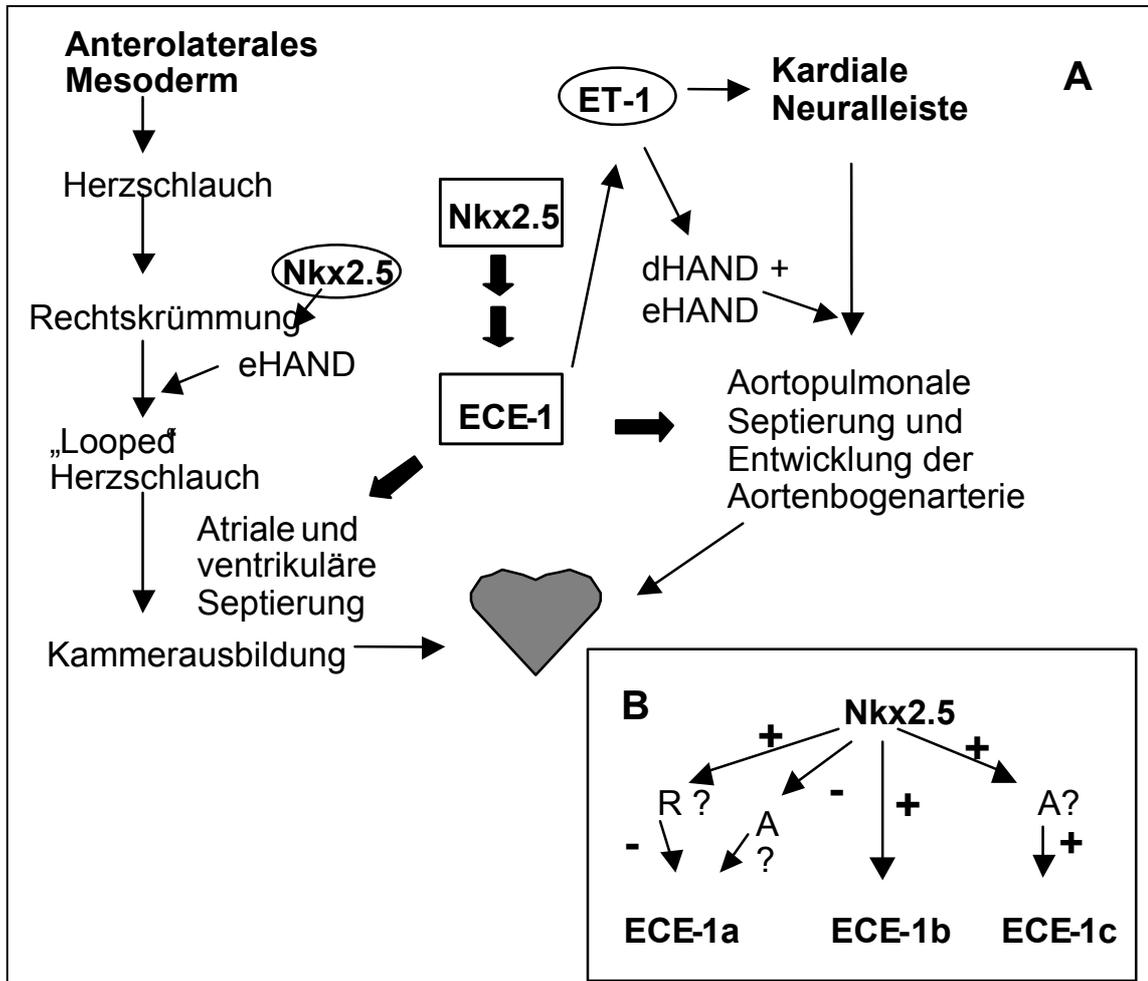


Abb. 5.1: Hypothetisches Modell des molekularen Weges der Herzentwicklung

Das schematische Diagramm (A) zeigt die möglichen Angriffspunkte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Faktoren innerhalb des morphogenetischen Prozesses der Herzentwicklung und ihre mögliche Interaktion *in vivo*.

Im unteren Teil der Abbildung (B) ist die differentielle Regulation der drei alternativen ECE-Promotoren durch Nkx2.5 zusammengefasst. Nkx2.5 aktiviert ECE-1b durch direkte Interaktion, während ECE-1c indirekt – über einen möglichen Aktivator (A) – aktiviert und ECE-1a indirekt – über Aktivierung eines Repressors (R) oder über Repression eines Aktivators – unterdrückt wird.

5.6 Folgerungen

Aufgrund der eingangs geschilderten Bedeutung von Nkx2.5 und des ECE-1 für die regelrechte Ausbildung des Herzens und der großen herznahen Gefäße und der hier beschriebenen transkriptionellen Interaktion zwischen Nkx2.5 und den alternativen ECE-1-Promotoren könnte man vermuten, daß die konotrunkalen Herzfehler bei Patienten mit einer Mutation im Gen für Nkx2.5 das Ergebnis einer Dysregulation der ECE-1-Isoform-Expression sein könnten. Eine derartige Verschiebung innerhalb der isoformspezifischen Expression müßte – aufgrund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation der einzelnen Isoformen - auch mit einer Verschiebung der subzellulären Lokalisation der Big-Endothelin-Konversion einhergehen und so die Balance zwischen den parakrinen und endokrinen Aufgaben des Endothelinsystems verschieben. Bei den hier untersuchten Patienten, von denen man nicht weiß, ob einer von ihnen evtl. eine Mutation im Nkx2.5-Gen trägt (was allerdings aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Patienten eher unwahrscheinlich ist), konnte zumindest auf mRNA-Ebene (mit den hier angewendeten analytischen Methoden) zum Zeitpunkt der Untersuchung ein offensichtlicher Isoformshift nicht nachgewiesen werden.

Doch gibt es noch weitere Hinweise, die für einen Zusammenhang zwischen Nkx2.5 und ECE-1 sprechen und die hier abschließend diskutiert werden sollen.

Neben seiner Bedeutung für die Ausbildung der konotrunkalen Region spielt ECE-1 auch eine zentrale Rolle innerhalb des kardialen Reizleitungssystems (Takebayashi-Suzuki et al. 2000). Die Konversion der Myozyten zu Purkinjefasern benötigt in vivo parakrine Signale aus den Blutgefäßen und kann in vitro durch eine ET-1-Exposition der Myozyten induziert werden (Takebayashi-Suzuki et al. 2000). Interessanterweise findet man bei Patienten, die eine Mutation im Nkx2.5-Gen tragen, neben den morphologischen kardialen Anomalien auch Störungen im Bereich des Reizleitungssystems, z.B. AV-

Blockierungen. In einigen Fällen manifestiert sich die Mutation nur in dem Vorliegen eines sogenannten idiopathischen AV-Blockes (Schott et al. 1998; Benson et al. 1999). Die differentielle, teils aktivierende, teils reprimierende Regulation der ECE-1-Isoformen durch den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 könnte auch für die Störungen innerhalb des Reizleitungssystems bei diesen Patienten mitverantwortlich sein.

Neben der Bedeutung für die Kardiogenese könnte die Interaktion zwischen Nkx2.5 und dem ECE-1 jedoch auch eine Rolle in der Pathogenese der erworbenen Herzkrankheiten des Erwachsenen spielen. Mehrere Arbeitsgruppen haben auf eine Rolle des Endothelinsystems, i.e.S. des ECE-1, oder des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 bei der Entstehung von Herzmuskelerkrankungen hingewiesen. Seneri et al. (2000) zeigten bei Patienten mit einer ischämischen Herzmuskelerkrankung eine Hochregulation von ECE-1 in Kardiomyozyten und Ergul et al. (2000) konnten im Tierversuch eine Hochregulierung von ECE-1 in linksventrikulären Myozyten insuffizienter (Schweine-) Herzen nachweisen. Thompson et al. (1998) konnten im Tierversuch bei induzierter Rechtsherzinsuffizienz eine erhöhte mRNA-Konzentrationen von Nkx2.5 im belasteten Ventrikel nachweisen. Vor dem Hintergrund der ECE-1-Regulation durch Nkx2.5 in vitro wäre eine Bestimmung der einzelnen Isoformen in diesem Modell interessant. Auch der Nachweis einer starken Expression von ECE-1c und -1b und einer schwachen von ECE-1a im Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) und in herzgesunder Spenderherzen (Zolk et al. 1999) steht in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten zu den Effekten von Nkx2.5 auf die alternativen ECE-1-Promotoren in Kardiomyoblasten, wobei Zolk et al. jedoch keine Verschiebung der isoformspezifischen Expression zwischen DCM und gesunden Herzen zeigen konnten.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Befunde erstmals, daß ein einzelner Transkriptionsfaktor (Nkx2.5) in der Lage ist gleichzeitig alternative Promotoren desselben Gens zu aktivieren (ECE-1b und ECE-1c) oder zu unterdrücken (ECE-1a). Dies könnte einen neuen Mechanismus der differentiellen Kontrolle der Gentranskription darstellen. Der Nachweis einer Interaktion zwischen dem kardialen Transkriptionsfaktor Nkx2.5 und dem Endothelinsystem könnte auf der Ebene der transkriptionellen Kontrolle eine Erklärung dafür sein, daß Patienten mit einer Mutation in dem Gen für Nkx2.5 konotrunkale Herzfehler aufweisen.