

## 6 Zusammenfassung

Die fundamentale Bedeutung des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 und dem Endothelin-Konvertierungsenzym-1 (ECE-1), für die Herzentwicklung konnte in zahlreichen Knock-out-Modellen der Maus gezeigt werden. In dieser Arbeit gelang zum ersten Mal der Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen Nkx2.5 und ECE-1.

Als Voraussetzung einer Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5 und den alternativen Promotoren des ECE-1 wurde zunächst die Koexpression auf Protein- (Nkx2.5) und mRNA-Ebene (Nkx2.5, ECE-1-Isoformen) in einer Kardiomyoblastenzelllinie, H9c2, nachgewiesen. Darüber hinaus wurde erstmals das isoformspezifische Expressionsmuster und die Expression von Nkx2.5 in embryonalen Rattenherzanlagen und in Herzgewebeproben von Patienten mit angeborenem Herzfehlern untersucht. In allen untersuchten Gewebeproben konnte, ebenso wie in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2, die Koexpression nachgewiesen werden.

Mit Luziferase-Reporter-Assays, Site-directed Mutagenese und Bandshift-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß Nkx2.5 die alternativen Promotoren des ECE-1 differentiell reguliert. In transient transfizierten Rattenkardiomyoblasten (H9c2) werden die spezifischen ECE-1b und -1c-Promotoren durch Koexpression mit dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5 aktiviert, während der ECE-1a-Promotor supprimiert wird. Die Wechselwirkung mit den alternativen ECE-1-Promotoren scheint dabei über unterschiedlich Mechanismen, teils direkt – für ECE-1b - und teils indirekt – für ECE-1a und -1c - vermittelt zu sein, was durch die Einführung von Mutationen in die Nkx2.5-Konsensussequenzen und durch Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion mittels Bandshift-Analyse nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der funktionellen Promotoranalyse und der Untersuchung der endogenen isoformspezifischen ECE-Expression in H9c2-Zellen, humanem fetalem und adultem Herzen und humanen Herzgewebeprobe – mit einer schwächeren Expression der ECE-1a-Isoform – sind somit übereinstimmend. Das isoformspezifische Expressionprofil kann zumindest teilweise durch die Wirkung des endogenen Nkx2.5 auf die drei alternativen ECE-Promotoren, einer transkriptionellen Aktivierung des ECE-1b und einer transkriptionellen Repression des ECE-1a und ECE-1c erklärt werden.

Vor dem Hintergrund der in der Literatur veröffentlichten Daten über die Expression von Nkx2.5 und ECE-1 im gesunden und insuffizienten Herzen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, daß Nkx2.5 auch in vivo ein entwicklungsbiologisch relevanter transkriptioneller Regulator der myokardialen ECE-1-Expression sein könnte. Der erstmalige Nachweis einer Interaktion zwischen dem kardialen Transkriptionsfaktor Nkx2.5 und dem ECE-1 könnte auf der Ebene der transkriptionellen Kontrolle auch eine mögliche Erklärung u.a. für das Vorliegen konotrunkaler bei Patienten mit einer Mutation im Nkx2.5-Gen und für die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz sein.