

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

**Transkriptionelle Regulation der Isoform c des humanen Endothelin-
Konvertierungs-Enzyms (ECE)-1**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
der Charité Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: Alexander Thomas
aus: Berlin

Gedruckt mit Genehmigung der Charité Universitätsmedizin Berlin

Gutachter 1: Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski

Gutachter 2: Prof. Dr. M. Bader

Disputation am: 24.04.2007

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1 DANKSAGUNG	6
2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
3 EINLEITUNG	12
3.1 Identifizierung der Endotheline	12
3.2 Expression, Synthese und Abbau der Endotheline	12
3.2.1 Expression	12
3.2.2 Synthese	13
3.2.3 Abbau	13
3.3 Die Endothelinrezeptoren	14
3.3.1 Charakterisierung des ETA-Rezeptors	14
3.3.2 Charakterisierung des ETB-Rezeptors	14
3.4 Die biologische Bedeutung der Endotheline	15
3.5 Die Endothelin-Konvertierungsenzyme	17
3.5.1 Identifizierung und Genstruktur	17
3.5.2 Biochemische Struktur und Enzymkinetik	17
3.5.3 Gewebeexpression von ECE	19
3.5.4 Biologische Bedeutung der Endothelin-Konvertierungsenzyme	20
3.5.4.1 Entwicklung	20
3.6 Grundlagen der isoformspezifischen Genexpression	22
3.6.1 Erläuterungen zu alternativen Promotoren	22
3.6.2 Erläuterungen zu Mikrosatelliten	23
3.6.3 Isoformspezifische Genregulation des ECE-1	24
4. FRAGESTELLUNG	25
5. MATERIALIEN UND METHODEN	26
5.1 Zellkultur	26
5.2 ECE-1c Promotorkonstrukte	26
5.3 Gezielte Mutierung von Konsensussequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren	26
5.4 Transfektionsexperimente	26
5.5 Analyse der mRNA-Expression	28
5.6 Proteinextraktion	28
5.7 EMSA (= “Electrophoretic mobility shift assay”)	29

5.8 Analyse der polymorphen Mikrosatelliten	31
5.9 Detektion der Methylierung	31
5.10 <i>In vitro</i>-Methylierung von gesamten Reporter-Plasmiden	32
5.11 „Patch“-Methylierung des Reporterplasmids	32
5.12 Die Sequenzanalyse	33
5.13 Die statistischen Analysen	33
5.14 Materialien	33
6 ERGEBNISSE	40
6.1 E2F-2 reguliert den humanen ECE-1c Promotor	40
6.2 Regulation des ECE-1c Promotors über die Sp1-Konsensusstelle an Position –179	42
6.3 Die positiv regulatorische Promotorregion zwischen –217 und –240 bindet NF-YB und kann durch GATA-2 transaktiviert werden	43
6.4 ECE-1c mRNA-Expressionsanalyse	45
6.5 Analyse der Mikrosatelliten der ECE-1c „upstream“-Promotorregion	47
6.6 Mikrosatelliten-Polymorphismen in dem ECE-1c Promotor beeinflussen die Transkriptionsaktivität	49
6.7 Der CG-Mikrosatellit ist in genomischer DNA nicht methyliert	50
6.8 ECE-1c Promotoraktivität wird durch <i>in vitro</i>-Methylierung unterdrückt	50
7 DISKUSSION	54
8 ZUSAMMENFASSUNG	59
9 LITERATURVERZEICHNIS	60
10 VERÖFFENTLICHUNGEN	73
11 LEBENS LAUF	74
12 ERKLÄRUNG ÜBER SELBSTÄNDIGKEIT	75

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1: Genomische Organisation des <i>ECE-1c</i> Gens	24
Abb. 2a: Aktivität der E2F-Mutation an Position –154 im Vergleich zum Wildtyp	40
Abb. 2b: EMSA der E2F-Familie	41
Abb. 3a: Aktivität der SP1-Mutationen an Position –21 und –179	42
Abb. 3b: EMSA der SP1-TF an Position –21 und –179	43
Abb. 4: Aktivitätssteigerung zw. Position –217 bis -240	44
Abb. 5a: EMSA zw. Position –217 und –240 an nukleären und zytosolischen Proteinen	45
Abb. 5b: EMSA mit NF-YB und GATA-2	45
Abb. 6a: RPA-Analysen von Geweben	46
Abb. 6b: RT-PCR-Analysen von Geweben	46
Abb. 7: Identifikation von heterozygot und homozygot polymorphen Individuen bezüglich der Mikrosatelliten	47
Abb. 8: Transkriptionsaktivität der Mikrosatellit-Polymorphismen	49
Abb. 9: Bindung der PCR-„Primer“ an Sodium-Bisulfid-modifizierte DNA im Hinblick auf den Methylierungsstatus des Promotors	50
Abb. 10: Promotoraktivität von Deletionsmutanten entweder methyliert oder nicht- methyliert	51
Abb. 11: Promotoraktivität der Deletionsmutanten – 512 und – 586 <i>in vitro</i> methyliert	52
Abb. 12: Promotoraktivität der Stellenmethylierung der Deletionsmutante – 490	53
Tabelle 1: Analyse der Mikrosatelliten-Region des humanen <i>ECE-1c</i> Promotors	48

1 DANKSAGUNG

Herrn Dr. Heiko Funke-Kaiser danke ich für die Ermöglichung, von seinem wissenschaftlichen und technischen Background zu profitieren, für die stetige Ansprechbarkeit und seine motivierende Art, Wissenschaft lebendig zu gestalten.

Herrn Privatdozent Dr. Hans-Dieter Orzechowski danke ich für die Überlassung des Themas und die gewissenhafte Betreuung dieser Promotion.

Herrn Prof. Dr. Martin Paul als damaliger Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie sei für die guten Forschungsbedingungen gedankt, die diese Arbeit ermöglichten.

Bei Frau Brigitta Schwaneberg und Frau Christel Meißner möchte ich mich ganz herzlich für die vielfältige technische Hilfe und die unentbehrlichen Tipps bei dem Erlernen von Methoden und die gute Zusammenarbeit im Labor danken.

Allen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für die anregenden Diskussionen bezüglich methodischer Fragestellungen und die positiv erlebte Arbeitsatmosphäre.

Meiner Mutter danke ich für die stetige Motivation, die emotionale Unterstützung und Begleitung, sowie die finanzielle Ermöglichung meines Studiums.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

Abb.

ACE

Arg

APS

Aqua dest.

ATP

bp

BRE

C

°C

Ca

cAMP

cDNA

Ci

Cl

cpm

DAG

DMEM

DNA

DNTP's

DPE

ds

DTT

Adenin

Abbildung

Angiotensin-Konvertierungsenzym

Arginin

Ammoniumpersulfat

desstilliertes Wasser

Adenosintriphosphat

Basenpaare

„TFIIB recognition element“

Cytosin

Grad Celsius

Kalzium

zyklisches Adenosinmonophosphat
(„cyclic AMP“)

komplementäre DNA

(„complementary DNA“)

Strahlungsequivalent von einem Gramm
Radium

Chlorid

„counts per minute“

Diacylglycerol

„Dulbecco's Modified Eagle Medium“

Desoxyribonukleinsäure

Desoxyribonukleosidtriphosphate

„downstream promotor element“

doppelsträngig

Dithiothreitol

EA.hy926

ECE
EDRF
EDTA
EGR1
EGTA
EMSA
ET-1
ETA
ETB
E2F

FCS

G

g
GATA
GIT

H

h
H₂O
HaCaT
HCl
HAT
HEPES

HSMC
HUVEC

IGF

Inr

Hybridzelllinie aus HUVEC und humanen Lungenkarzinomzellen

Endothelin-Konvertierungsenzym
„endothelium derived relaxing factor“
Ethyldiaminessigsäure
Transkriptionsfaktor
„ethylene glycol tetraacetic acid“
„electrophoretic mobility shift assay“
Endothelin-1
Endothelinrezeptor Typ A
Endothelinrezeptor Typ B
Transkriptionsfaktor

fetales Kälberserum („fetal calf serum“)

Guanin

Formelzeichen für Fallbeschleunigung
Transkriptionsfaktorbindungsstelle
Gastrointestinaltrakt

Wasserstoff

Stunde
Wasser
humane Keratinozytenzelllinie
Chlorwasserstoffsäure = Salzsäure
Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
„hydroxyethyl-piperazineethanesulfonic acid“
„human skin mast cells“
humane, umbilikale, venöse Endothelzellen
(„human umbilical vein endothelial cells“

„Insulin-like growth factor“

Initiator

IP₃

Ionositoltriphosphat

KELLY

humane Neuroblastomzelllinie

KCl

Kaliumchlorid

KOH

Kalilauge

LAR II

„Luciferase assay reagent II“

LB-Medium

„lysogeny broth“-Medium

Lys

Lysin

m

molar

mM

Millimolar

mA

Milli-Ampere

MCF7

humane Mammakarzinomzelllinie

µg

Mikrogramm

MgCl

Magnesiumchlorid

min

Minute

ml

Milliliter

µl

Mikroliter

µmol

Mikromol / mikromolar

mRNA

„messenger“-Ribonukleinsäure

N

Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin

Na

Natrium

NEAA

nicht essentielle Aminosäuren
(„non-essential amino acids“)

NEP

neutrale Endopeptidase

NF-YB

Transkriptionsfaktor

ng

Nanogramm

NO

Stickstoffmonoxid

nt

Nukleotid

ODN

Oligodeoxynukleotid

OH	Mokekülbezeichnung: Sauerstoff- Wasserstoff
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
Pen.	Penicillin
PKC	Proteinkinase C
PLB	„passive lysis buffer“
poly [d(I-C)]	„polydeoxy (inosinate-cytidylate)“
ppET-1	Präproendothelin-1
Pyr	Pyrimidin
p- / P-	Phosphor
ρ-	Pico-
RLA	relative Luziferaseaktivität
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“
RPA	„ribonuclease protection assay“
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	reverse Transkription
S-	Schwefel-
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
Strept.	Streptomycin
T	Thymin
TAF	TBP-assozierte Faktoren
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBP	TATA-bindendes Protein
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamid

TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	„unit“
Val	Valin
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen („vascular smooth muscle cells“)
X	Platzhalter für beliebige Zahl

8 ZUSAMMENFASSUNG

Humanes „endothelin-converting-enzyme“ (ECE)-1, das Hauptenzym in der Endothelinbiosynthese, zeigt eine breite Zell- und Gewebeexpression innerhalb des Kardiovaskulären Systems. Die Expression von ECE-1c, das die Hauptisoform repräsentiert, wird gelenkt durch einen alternativen Promotor. Die Mechanismen der ECE-1c Promotorregulation waren jedoch bisher weitestgehend unbekannt. Da die ECE-1c Transkription von mehreren Startpunkten aus beginnt, konnte man eine ECE-1c Promotorfunktion als „housekeeping“ Promotor annehmen.

Mittels „promotor reporter assays“, „gel-shifts“ und „supershift assays“ konnte die Funktionalität von *cis*-wirkenden Elementen für die Bindung der CAAT-Box bindenden Proteine NF-YB, GATA-2, E2F und eines GC-Box bindenden Faktors, die räumlich assoziiert sind mit den Transkriptionsstartpunkten des ECE-1c, in humanen endothelialen EA.hy926-Zellen demonstriert werden. In der mehr „upstream“ gelegenen Promotorregion wurden drei hoch polymorphe Dinukleotidwiederholungen, 5'(CA)_n, (CG)_n und 3'(CA)_n, identifiziert, die die Promotorfunktion in endothelialen EA.hy926-Zellen stark beeinflussen (2,7-fache Aktivierung, wenn man das am stärksten aktive mit dem am wenigsten aktiven Allel vergleicht) und in ähnlicher Weise in humanen neuronalen KELLY-Zellen.

Die Ergebnisse bilden eine molekulare Erklärung für die grundlegende Expression von ECE-1c mRNA. Die Modulation durch genetische und epigenetische Mechanismen, die in dieser Studie gezeigt wurden, könnte für die interindividuelle Variation der grundlegenden Endothelinsystemaktivität beim Menschen angesehen werden und darüberhinaus die individuelle Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen beeinflussen.

10 VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten:

Funke-Kaiser H, Lemmer J, Langsdorff CV, Thomas A, Kovacevic SD, Strasdat M, Behrouzi T, Zollmann FS, Paul M, Orzechowski HD (2003)

Endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) is a downstream target of the homeobox transcription factor Nkx2-5. *FASEB J* 17(11):1487-9.

Funke-Kaiser H, Thomas A, Bremer J, Kovacevic SD, Scheuch K, Bolbrinker J, Theis S, Lemmer J, Zimmermann A, Zollmann FS, Herrmann SM, Paul M, Orzechowski HD (2003)
Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites. *J Hypertens* 21:2111-2124

Funke-Kaiser H, Theis S, Behrouzi T, Thomas A, Scheuch K, Zollmann FS, Paterka M, Paul M, Orzechowski HD (2001)

Functional characterization of the human prion protein promoter in neuronal and endothelial cells. *J Mol Med* 79(9):529-35.

Abstract:

Thomas A, Wagner M, Pöll C, Weber CS, Felsenberg D, Deter HC (2005)

Psychologische Faktoren und physiologische Stressreagibilität während 8-wöchiger Immobilisation bei gesunden männlichen Probanden. *Psychother Psych Med* 55 DOI: 10.1055/s-863573

11 LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 ERKLÄRUNG ÜBER SELBSTÄNDIGKEIT

„Ich, Alexander Thomas, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Transkriptionelle Regulation der Isoform c des humanen Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE)-1“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Alexander Thomas