

7 DISKUSSION

Das humane ECE-1 wird in mindestens vier Isoformen exprimiert. Die ECE-1c Isoform stellt offenbar, nach den Expressionsanalysen, die von anderen Arbeitsgruppen und meiner (= Arbeitsgruppe unter der Leitung von PD Dr. med. Orzechowski) durchgeführt worden waren, eine Hauptisoform dar (Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999a; Funke-Kaiser et al., 2000). Zuvor wurden in meiner Arbeitsgruppe mehrere Transkriptionsstartpunkte im humanem ECE-1c Promotor, dem ebenso wie den alternativen ECE-1 Promotoren eine TATA-Box fehlt, identifiziert. Stattdessen enthält die proximale Promotorregion Konsensussequenzen für mögliche Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren E2F und SP1 und zwei CAAT-Boxen, die möglicherweise alle in den Transkriptionsstart involviert sind.

Die E2F-Konsensussequenz trägt stark zu der ECE-1c Promotorfunktion in humanen, endothelialen EA.hy926 bei. Seine Lokalisation direkt „upstream“ von einem der Haupttranskriptionsstartpunkte bei ungefähr -140 (Abb. 1) läßt vermuten, daß dieses Element bei dem Transkriptionsstart eine wichtige Rolle spielt. Es wurde kein Initiatorelement in direkter Umgebung identifiziert; trotzdem könnten E2F-Faktoren direkt den Transkriptionsstart über die Interaktion mit RNA-Polymerase-II-assoziierten Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Emili et al., 1995). Die Supershift-Assays mit Kernextraktproteinen aus humanen Endothelzellen demonstrierten deutlich, daß die E2F-Konsensussequenz im proximalen ECE-1c Promotor fähig ist, ein Mitglied der E2F-Familie, nämlich E2F-2, zu binden. Die E2F-Familie der Transkriptionsfaktoren umfasst sechs Unterformen (bezeichnet E2F-1 bis E2F-6) und hat ihre entscheidende Bedeutung in der Zellzykluskontrolle. E2F-1 war das erste Gen, bei dem die Wirkung als Onkogen, aber auch als Tumorsuppressorgen (Weinberg, 1996), gezeigt werden konnte. Das Letztere wurde in einer experimentellen Gentherapie des Glioblastoma multiforme ausgenutzt (Fueyo et al., 1998). Zusammen mit E2F-1 und E2F-3 bildet E2F-2 die Untergruppe der aktivierenden E2F's, wohingegen E2F-4, -5 u. -6 die transkriptionelle Repression vermitteln (Trimarchi et al., 2002). Zuletzt konnte in meiner Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß das differentielle Binden von E2F-2 an ein polymorphes *cis*-wirkendes Element im ECE-1b Promotor mit Hypertension bei Frauen assoziiert ist (Funke-Kaiser et al., 2003b).

Dann wurde die Funktionalität von zwei SP1-Konsensussequenzen, die bei 21 bp und 179 bp „upstream“ des Transkriptions-Startkodons lokalisiert sind, untersucht. In CG-reichen Promotoren, was auf den ECE-1c-Promotor zutrifft und weiter unten diskutiert wird, sind SP1-

Bindungsstellen oft mit Transkriptionsstartpunkten, die zwischen 40 bp und 80 bp „downstream“ lokalisiert sind, assoziiert (Smale, 1994). Darüberhinaus, wie in vielen Genen, denen eine TATA-Box fehlt, kann die SP1-Bindung an ein proximales *cis*-Element durch seine Fähigkeit, TFIID zu rekrutieren, kritisch die basale Promotoraktivität beeinflussen (Goodrich et al., 1996; Fry et al., 1999). Es war möglich zu zeigen, daß beide SP1-Konsensussequenzen im humanen ECE-1c-Promotor die Fähigkeit haben, einen Transkriptionsfaktor zu binden.

Nichtsdestoweniger war nur das SP1(-179)-Element von funktioneller Signifikanz. Das Ergebnis ist nicht unerwartet, da die SP1(-21)-Stelle „downstream“ von allen identifizierten Transkriptionsstartpunkten lokalisiert ist, wohingegen das SP1(-179)-Element um die 40 bp „upstream“ eines spezifischen Startpunktes gelegen ist. Der Transkriptionsstartpunkt bei – 140 bp in dem ECE-1c-Promotor ist bei einer angemessenen Distanz von ungefähr 75 bp zu einer CAAT-Box, die ein GATA-Motiv (Abb. 1) überlappt, lokalisiert. Weil diese Promotorregion (-217 bis –240) stark die Promotoraktivität reguliert, wurde untersucht, welche dieser beiden Motive in EA.hy926-Zellen funktionell sind. Bei einige Transkriptionfaktoren, wie C/EBP, NF-1, NF-Y (auch CP1 oder CBF genannt) und CP2, konnte gezeigt werden, daß sie an CAAT-Boxen binden (Alonso et al., 1996; Mantovani, 1998). In dieser Studie wurde gezeigt, daß NF-YB (auch CBF-A genannt), das Teil des ubiquitären heterotrimären Faktors NF-Y ist, an den proximalen ECE-1c Promotors bindet. Trotzdem deuten die Kotransfektionsexperimente an, daß GATA-2 auch das Potenzial hat, den ECE-1c-Promotor zu transaktivieren. Die Transaktivierung des ECE-1c-Promotors durch GATA-Faktoren könnte eine Rolle in Zellen spielen, die diese Faktoren exprimieren, und impliziert eine Konkurrenz um die Bindung an die DNA zwischen NF-Y und GATA. Konkurrenz zwischen grundlegend exprimierten und induzierten Transkriptionsfaktoren mit Blick auf die Bindung an die selben oder überlappende Promotorstellen ist ein üblicher Mechanismus der Transkriptionsregulation und wurde zum Beispiel in großem Ausmaß für SP1 und EGR-1 untersucht (Khachigian et al., 1998).

Auf der Basis dieser Ergebnisse ist eine gemeinsame Aktion der Transkriptionsfaktoren E2F-2, SP1 und NF-Y in der Regulation des ECE-1c-Promotors anzunehmen, da bei E2F und SP1, aber auch E2F und NF-Y, gezeigt wurde, daß sie im Hinblick auf die Promotoraktivierung kooperieren. Darüberhinaus kann SP1 physikalisch mit E2F-1, E2F-2 und E2F interagieren und viele E2F-regulierte Promotoren enthalten SP1 oder NF-Y bindende Stellen, oder beide (Fry et al., 1999).

Im Allgemeinen sind sog. „housekeeping“-Gene durch eine breite Gewebeverteilung der Expression, mehrere Transkriptionsstartpunkte und durch Strukturcharakteristiken ihrer Promotoren, wie das Fehlen eines TATA-Motivs, mehrere potenzielle SP1-Bindungsstellen und einen hohen Gehalt von CG-Dinukleotiden, die oft in sogenannten CpG-Inseln organisiert sind, definiert (Dynam, 1986; Schibler et al., 1987; Ishimaru et al., 1995). All dies trifft auf den humanen ECE-1c-Promotor zu. Bei jedem Zelltyp, eingeschlossen der endothelialen, neuronalen, glialen, epidermalen und hämatopoetischen Zellen, und jedem in dieser Studie und anderen Studien untersuchten Gewebe (Schweizer et al., 1997; Valdenaire et al., 1999a) wurde gefunden, daß sie ECE-1c-mRNA exprimieren. Die Existenz von mehreren Transkriptionsstartpunkten wurde zuvor durch meine Arbeitsgruppe berichtet (Funke-Kaiser et al., 2000), und die Funktionalität des SP1-Motivs bei -179 wurde in dieser Studie gezeigt. Die Regulation durch das ubiquitäre CAAT-Box-bindende Protein NF-YB unterstreicht weiterhin die basale Regulation dieses Promotors. Zusätzlich zeigt die CAAT-Box innerhalb des proximalen ECE-1c Promotors eine reverse Orientierung. Dies ist auch bei der Mehrheit der TATA-losen Promotoren der Fall (Mantovani, 1998). Es sollte nochmals betont werden, dass der Begriff „housekeeping“ nicht weniger Regulation im Sinne einer Quantifizierung nahe legt, sondern ein konstantes Level der Aktivierung (Dynam, 1986). Dies wird durch letzte Ergebnisse der positiven Regulation des ECE-1c-Promotors durch den kardialen Transkriptionsfaktor, Nkx2-5, unterstrichen (Funke-Kaiser et al., 2003a). Der ECE-1c-Promotor zeigt eine völlig andere Promotorarchitektur und einen anderen Regulationsmechanismus verglichen mit dem ECE-1a-Promotor, der stark durch die Aktivierung des Proteinkinase-C-Signalwegs induziert wird, wobei der Transkriptionsfaktor Ets-1 in humanen Endothelzellen involviert ist (Orzechowski et al., 2001).

Mikrosatelliten, bestehend aus einer Anordnung von einer aufeinanderfolgenden Reihe von Wiederholungen von 1 – 4 bp Länge, sind im ganzen Genom verteilt. CA-Dinukleotid-Wiederholungen sind sehr üblich, repräsentieren 0,5 % des Genoms und sind oft hoch polymorph im Hinblick auf die Länge der Wiederholungen (Weissenbach, 1993). Im Gegensatz zu CA-Wiederholungen sind CG-Wiederholungen selten und repräsentieren nur um die 0,1 % von allen Dinukleotid-Wiederholungen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Im Hinblick auf die Schlüsselrolle des ECE-1c in der Endothelinbiosynthese könnte der funktionelle Einfluß der ECE-1c-Promotorpolymorphismen in Endothelzellen von pathyphysiologischer Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen, z.B. Phänotypen des Blutdruckes, sein. Dies ist interessant, weil nach unseren Reporter-genuntersuchungen der ECE-

1c Promotor unter basalen Bedingungen potenter als der ECE-1a- oder ECE-1b Promotor ist (Funke-Kaiser et al., 2000). Der Einfluß von individuellen Allelen auf den ECE-1c-Promotor scheint unabhängig vom Zelltyp zu sein, da eine große Ähnlichkeit zwischen der relativen Aktivität von allelspezifischen Promotorkonstrukten in humanen Endothelzellen (Ea.hy926) und neuronalen Zellen (KELLY) besteht. Dies betont zusätzlich die „housekeeping“-Eigenschaft des ECE-1c-Promotors. Veränderungen der Allele der ECE-1c-Promotoraktivität in neuronalen KELLY-Zellen könnten nicht nur bei der zentralen Blutdruckregulation, wie früher bereits detailliert beschrieben (Sluck et al., 1999), sondern auch in der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sein, weil zuletzt gezeigt wurde, daß ECE-1 β -Amyloid-Peptide degradieren kann (Eckman et al., 2001).

Bereits seit langem war die Methylierung von CG-Dinukleotiden als wichtiger Mechanismus der eukaryonten Genregulation bekannt. Sie spielt eine Rolle in der X-Chromosom-Inaktivierung (Mohandas et al., 1981), dem genetischen „Imprinting“ (Barlow, 1995) oder in der Suppression von parasitären Sequenzelementen (Yoder et al., 1997). Die Nukleotidsequenz der ECE-1c Promotorregion -986 bp „upstream“ des vermuteten ECE-1c spezifischen Translationstartkodons erfüllt die Kriterien einer CpG-Insel, wie sie von Gardiner-Garden und Frommer (Gardiner-Garden et al., 1987) definiert wurden, da sie einen CG-Gehalt von 64 % und ein CpG beobachtet/erwartetes Verhältnis von 0.91 zeigt (Funke-Kaiser et al., 2000). Dies unterstreicht die „Housekeeping“-Eigenschaften des ECE-1c-Promotors zusätzlich. Mittels zwei unterschiedlicher Techniken wurde gezeigt, daß die Aktivität des humanen ECE-1c-Promotors durch Methylierung *in vitro* supprimiert wird. Die durchgeführten Experimente dieser Arbeit deuten an, daß der (CG)_n – (CA)_n-Mikrosatellit in der ECE-1c-Promotorregion ein positiv regulatorisches Element darstellt, dessen Funktion unabhängig vom Methylierungs-Status der CG-Dinukleotid-Wiederholung ist (Abb. 11). Entsprechend der TRANSFAC-Datenbank ist ein vermuteter Transkriptionsfaktor, der an eine (CG)_n – (CA)_n Mikrosatellitenwiederholung bindet, bisher unbekannt und muss erst noch identifiziert werden. In diesem Kontext ist es von Interesse, daß von Transkriptionsfaktoren mit einer Bindungsaffinität, die nicht durch Methylierung verändert wird, wie YY1, bereits berichtet wurde (Bergman et al., 1998). Da der (CG)_n – (CA)_n Mikrosatellit hoch polymorph und funktionell bezüglich der Promotoraktivität ist, wäre es von Interesse zu untersuchen, ob und wie die Anzahl der Wiederholungen die möglichen Protein-DNA-Interaktionen beeinflusst.

Vom zellulären Standpunkt aus wird der ECE-1c Promotor durch Mechanismen reguliert, die typisch sind für „Housekeeping“-Promotoren, und weniger durch spezifische Stimuli. Im Hinblick auf die interindividuelle Variation wird der ECE-1c Promotor dennoch stark durch

genetische Mechanismen (z. B. Polymorphismen) beeinflusst und trägt das Potenzial einer epigenetischen Modulation (z. B. Methylierung). Aus diesem Grund können die Mechanismen der ECE-1c Promotorregulation den grundlegenden Zustand der Aktivierung des Endothelinsystems beeinflussen und dadurch die Prädisposition für Krankheiten, bei denen die Endotheline involviert sind, modulieren.