

Aus dem CharitéCentrum für Therapieforschung
Institut für Pharmakologie/ Center for Cardiovascular Research (CCR)
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Unger

Habilitationsschrift

Genregulation im Endothelin- und Renin-Angiotensin-System

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pharmakologie und Toxikologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Heiko Funke-Kaiser
geboren am 18.9.1968 in Oberhausen

Eingereicht: Oktober 2007

Dekan: Professor Dr. med. Martin Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. Lutz Hein, Freiburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht, Giessen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung - Genregulation und Promotorarchitektur	4
2.	Inhaltliche und methodische Aspekte zur Untersuchung der Genregulation	7
2.1	<i>Eigene Arbeiten</i> - Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)	8
2.2	<i>Eigene Arbeiten</i> - Real-time PCR-Datenanalyse mit der GED-Formel	9
3.	Endothelinsystem	10
3.1	Das Endothelin-Konvertierungsenzym-1 (ECE-1)	10
3.2	<i>Eigene Arbeiten</i> - Klonierungen und funktionelle Charakterisierungen der isoformspezifischen Promotoren des ECE-1	12
3.3	Die Rolle des ECE-1 und des Transkriptionsfaktors Nkx2-5 im Rahmen der Herzentwicklung	13
3.4	<i>Eigene Arbeiten</i> - Regulation des ECE-1-Gens durch Nkx2-5	15
4.	Renin-Angiotensin-System	16
4.1	Der AT2-Rezeptor (AT2R)	16
4.2	<i>Eigene Arbeiten</i> - Klonierung und funktionelle Charakterisierung des ATBP	17
4.3	Der Renin-/ Prorenin-Rezeptor (RER)	19
4.4	<i>Eigene Arbeiten</i> - Entschlüsselung der Signaltransduktion des RER	21
5.	Prionen-Protein	23
5.1	Prionen und Prionenerkrankungen	23
5.2	<i>Eigene Arbeiten</i> - Funktionelle Charakterisierung des Promotors des humanen Prionen-Proteins	23
6.	Funktionelle Charakterisierungen von Promotorpolymorphismen	24
6.1	<i>Eigene Arbeiten</i> - Polymorphismen im Cathepsin G-Genpromotor	24
6.2	<i>Eigene Arbeiten</i> - Polymorphismen im ECE-1b-Genpromotor	25
6.3	<i>Eigene Arbeiten</i> - Polymorphismen im ECE-1c-Genpromotor	26
7.	Epigenetik	27
7.1	Bedeutung der Epigenetik	27
7.2	<i>Eigene Arbeiten</i> - Epigenetische Aspekte der Regulation des ECE-1c-Promotors	28
8.	Dimensionen der transkriptionellen Regulation	29
9.	Therapeutische Aspekte	31
10.	Zusammenfassung	34

11.	Eidesstattliche Erklärung	35
12.	Danksagung	36
13.	Literaturverzeichnis	37
14.	ANLAGE - Ausgewählte Originalarbeiten (O)	
14.1	Scheffe, J.H., [...], Funke-Kaiser, H. (2006) Circ. Res. 99	O1355-O1366
	Scheffe, J.H., [...], Funke-Kaiser, H. (2006) Circ. Res. 99 (<i>Supplement</i>)	S1-S13
14.2	Scheffe, J.H., [...], Funke-Kaiser, H. (2006) J. Mol. Med. 84	O901-O910
14.3	Funke-Kaiser, H. et al. (2003) J. Hypertens. 21	O2111–O2124
14.4	Funke-Kaiser, H. et al. (2003) FASEB J. 17	O1487-O1489
14.5	Funke-Kaiser, H. et al. (2001) J. Mol. Med. 79	O529-O535
14.6	Funke-Kaiser, H. et al. (2003) Hum. Mol. Genet. 12	O423-O433

1. Einführung - Genregulation und Promotorarchitektur

Eukaryontische Genregulation, insbesondere auf Promotorebene, stellt den Fokus der im nachfolgenden beschriebenen Forschungsarbeit dar, wobei folgende Schwerpunkte bestehen:

- (1) basale Mechanismen der transkriptionellen Regulation inklusive epigenetischer Aspekte,
- (2) funktionelle Charakterisierung von Promotorpolymorphismen,
- (3) transkriptionelle Regulation bei entwicklungsbiologischen Prozessen, sowie
- (4) Genregulation im Rahmen kardiovaskulärer und neuronaler Physiologie und Pathophysiologie.

Promotoren sind regulative Schlüsselemente in unserem Genom, welche die Transformation von genetischer Information in Struktur bedingen. Sie bestimmen, wann (z.B. im Rahmen der Embryonalentwicklung), wo (d.h. Gewebe- bzw. Zellspezifität) und unter welchen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen ein Gen transkribiert wird.

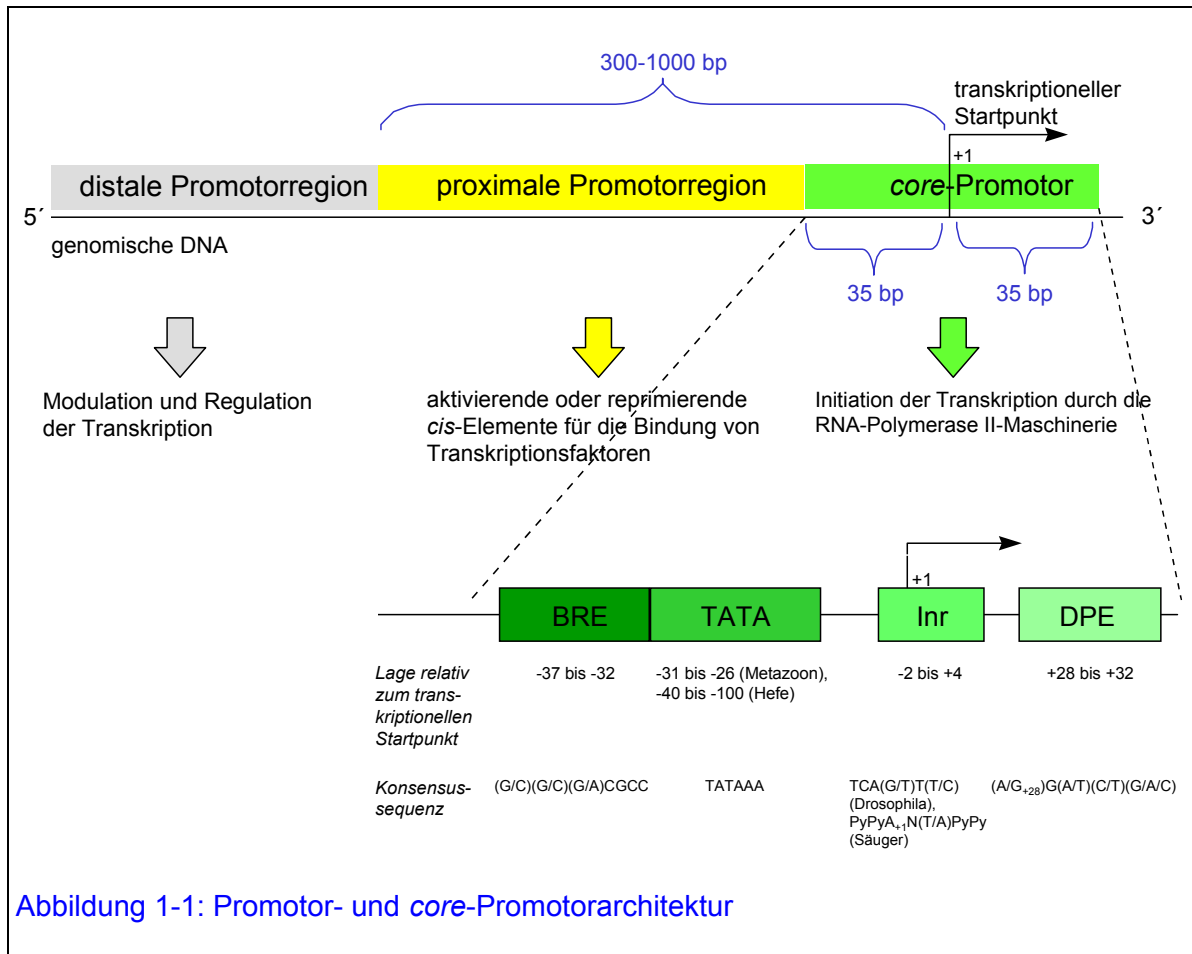
Promotoren besitzen eine bestimmte Architektur und lassen sich unter funktionellen Aspekten in drei Regionen unterteilen^{1, 2, 3, 4, 33} (Abbildung 1-1):

- (1) Der sogenannte *core*-Promotor umfasst eine Region von ca. ± 35 Basenpaaren (bp) *upstream* und *downstream* des transkriptionellen Startpunktes und reicht aus, die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II (RNAP II) zu vermitteln.
- (2) Die sogenannte proximale Promotorregion, welche sich bis ungefähr 300 bp oberhalb der Transkriptionsstartstelle erstreckt, umfasst viele aktivierende oder hemmende *cis*-Elemente, welche Transkriptionsfaktoren (TFs) binden und so die Promotoraktivität modulieren.
- (3) Weiterhin tragen die distale Promotor-Region und sog. *enhancer*- bzw. *silencer*-Elemente zur Promotorregulation bei, wobei die letzteren unter anderem darüber definiert sind, dass sie hunderttausende von Basenpaaren oberhalb oder unterhalb des regulierten Gens lokalisiert sein können.

Zur Initiation der Transkription muss der sog. basale Transkriptionsapparat, welcher auch als RNA-Polymerase II-Maschinerie bezeichnet wird, an die *core*-Promotorregion gebunden haben^{1, 3, 5, 6}. Bei diesem basalen Transkriptionsapparat handelt es sich um einen Proteinkomplex, der aus den sog. *general transcription factors* (GTFs) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIFH besteht, die mit der RNAP II assoziieren, um den sog. Präinitiationskomplex (PIC) zu bilden. TFIID ist selbst wiederum ein Multiproteinkomplex, welcher aus dem *TATA box*-bindendem Protein (TBP) und mindestens 13 sogenannten TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) besteht¹.

Zum weiteren funktionellen Verständnis der Transkriptionsinitiation ist von Bedeutung, dass der oben erwähnte *core*-Promotor vier verschiedene Sequenzelemente, sog. *major core promoter elements*, aufweisen kann^{1, 7, 8, 9, 10} (Abbildung 1-1):

- (1) Die *TATA box* wird im Rahmen der oben erwähnten PIC-Assemblierung von TBP erkannt, was wiederum die Bindung des basalen Transkriptionsapparates einleitet.
- (2) Der Initiator (Inr) befindet sich im Bereich der transkriptionellen Startstelle und kann u.a. die Position der Startstelle in Promotoren ohne *TATA box* determinieren.
- (3) Das sog. BRE (*TFIIB recognition element*), welches von TFIIB sequenzspezifisch gebunden wird, ist - sofern vorhanden - direkt oberhalb der *TATA box* lokalisiert.
- (4) Das sog. *downstream core promoter element* (DPE), welches initial bei *Drosophila* identifiziert wurde, aber auch in menschlichen Promotoren gefunden werden kann, bindet auch TFIID, jedoch nicht das TBP. Da beinahe alle Promotoren, die ein DPE besitzen, keine *TATA box* aufweisen, scheint das DPE ein funktionelles Gegenstück zur *TATA box* darzustellen.



Promotoren sind in der Postgenomära von grundsätzlicher Bedeutung, da mittels alternativer Promotoren eines Gens (s.a. Abschnitt 3.1) aus diesem multiple Isoformen generiert werden können und so die Größe des Transkriptoms relativ zum Genom erhöht werden kann^{11, 12}. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Genanzahl selbst nicht mit der Komplexität einer Spezies korreliert, da der Mensch nur ca. 20.000 bis 30.000 Gene besitzt, während der Wurm *Caenorhabditis elegans* beispielsweise knapp 20.000 Gene aufweist^{13, 14, 33, 15}. Demgegenüber scheint die Komplexität einer Spezies durch eine elaborierte Genregulation bedingt zu sein¹⁵.

Weiterhin können alternative Promotoren zu räumlicher (d.h. zellspezifischer) und zeitlicher (z.B. bezogen auf entwicklungsbiologische Prozesse) Regulation der Genexpression beitragen. Sie können außerdem die subzelluläre Lokalisation und stimulusspezifische Regulation von Isoformen beeinflussen^{16, 17, 18}.

Promotoren sind darüber hinaus von ontogenetisch-phylogenetischer Bedeutung, da Prozesse der Embryonalentwicklung insbesondere auf transkriptioneller Ebene reguliert werden^{19, 20}, und Transkriptionsfaktoren sowie deren Promotor-Interaktionen selbst für die humane Evolution von Bedeutung zu sein scheinen^{21, 22, 23}.

Die (patho)physiologische Relevanz von Promotoren zeigt sich auch anhand des Effektes von genetischen Polymorphismen (z.B. *single nucleotide polymorphisms* (SNPs)) in Promotorbereichen, die assoziiert sein können mit:

- psychologischen Merkmalen, z.B. Neurotizismus²⁴,
- physiologischen Merkmalen, z.B. Serumspiegel von Bilirubin²⁵ oder des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE)²⁶,
- der Anfälligkeit für bestimmte Erkrankungen, z.B. für zerebrale Malaria²⁷ oder das *Helicobacter pylori*-assoziierte Magenkarzinom²⁸.

Darüber hinaus spielen Promotorpolymorphismen eine Rolle bei

- der vieldiskutierten Gen-Umwelt-Interaktion im Rahmen von depressiven Erkrankungen²⁹,
- bei der Stärke der Assoziation zwischen Körpergewicht und Blutdruck³⁰,
- pharmakodynamischen Fragestellungen, wie z.B. dem Ansprechen auf bestimmte Antiasthmatica³¹, oder pharmakokinetischen Fragestellungen, wie z.B. Zytostatikametabolismus und assoziiertem Leukämierisiko³².

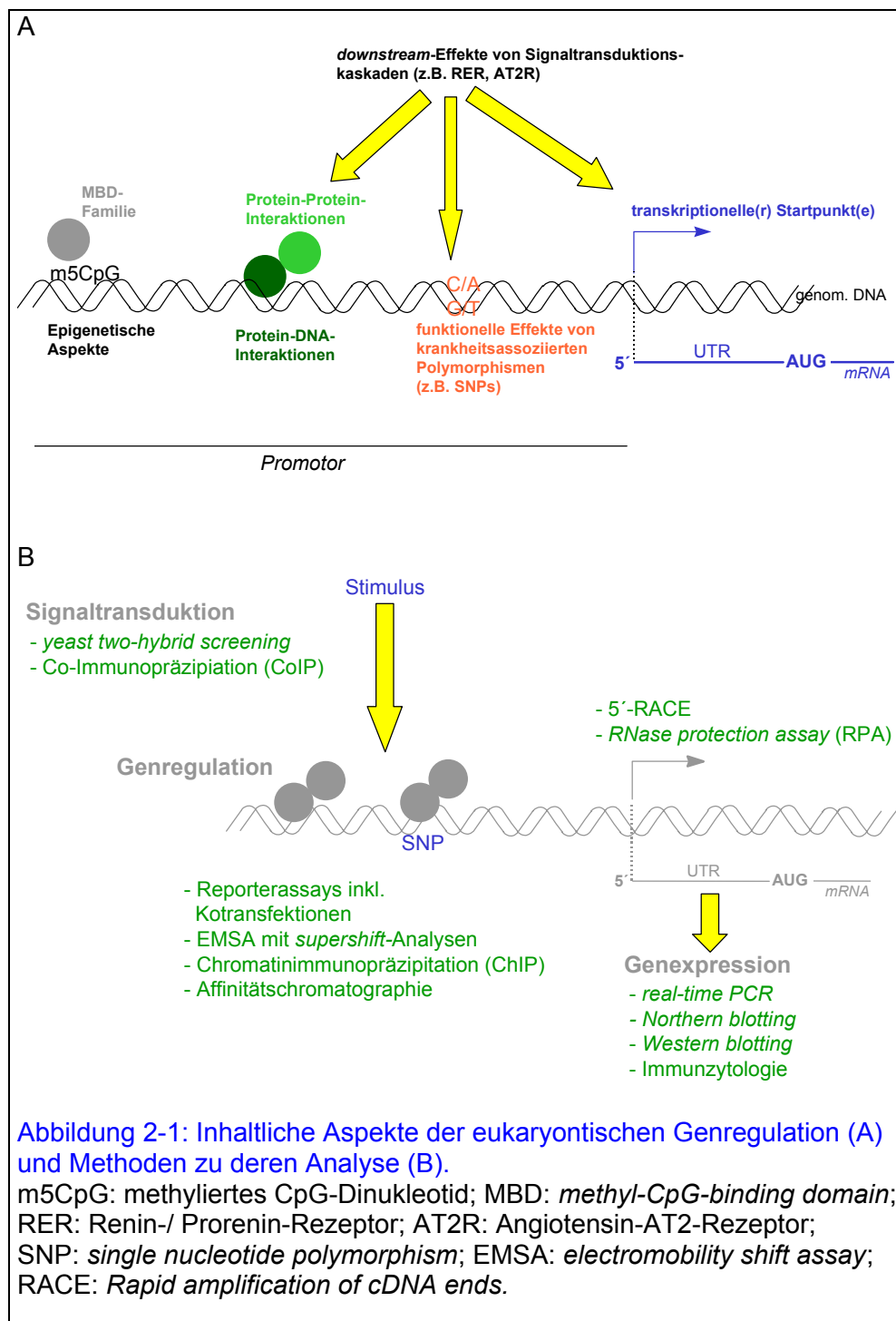
In Abgrenzung zu den zuvor beschriebenen Promotorpolymorphismen, welche nur eine Assoziation mit bestimmten Phänotypen aufweisen, wurden auch Mutationen in Promotorregionen oder in Faktoren des basalen Transkriptionsapparates beschrieben. Diese können die Ursache für unterschiedliche Erkrankungen wie beispielsweise Thalassämie, Epilepsie oder Xeroderma pigmentosum sein³³.

2. Inhaltliche und methodische Aspekte zur Untersuchung der Genregulation

Die nachfolgend in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen auf dem Gebiet der Genregulation lassen sich in die folgenden Aspekte gliedern (Abbildung 2-1A):

- (1) Analyse von Protein-DNA- bzw. Protein-Protein-Interaktionen und von Effekten, welche Signaltransduktionskaskaden auf *downstream*-gelegene Promotoren ausüben (Abschnitte 3, 4 und 5),
- (2) funktionelle Charakterisierung von Promotorpolymorphismen (Abschnitt 6) und
- (3) epigenetische Mechanismen der Genregulation (Abschnitt 7).

Um diese inhaltlichen Aspekte untersuchen zu können, konnten wir das in [Abbildung 2-1B](#) dargestellte Methodenspektrum etablieren.



2.1 Eigene Arbeiten - Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Die Methode Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) erlaubt, Protein-DNA-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren im Chromatinkontext und prinzipiell bezüglich des Gesamtgenoms zu analysieren³⁴. Aufgrund der Bedeutung des Chromatinkontextes für die Genregulation^{35, 36, 37} können mit dieser Methode daher im Vergleich zu *in vitro*-Methoden wie *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) oder *DNase footprinting* genauere Einblicke in Regulationsmechanismen gewonnen werden.

Darüber hinaus kann mittels ChIP auch die Rekrutierung von Kofaktoren (z.B. Untereinheiten des Mediator-Komplexes³⁸) und von histonmodifizierenden Enzymen wie HATs (Histon-Acetyltransferasen) untersucht werden³⁹.

ChIP basiert darauf, dass Zellen mittels Formaldehyd fixiert werden, um sogenannte Protein-DNA-*crosslinks* zu bedingen. Nach einer sich anschließenden Zellyse wird die genomische DNA mit den gebundenen Transkriptionsfaktorkomplexen mittels Ultraschall fragmentiert. Schließlich erfolgen eine Immunopräzipitation gegen den zu analysierenden Transkriptionsfaktor, eine Revertierung des *crosslinks* und eine Analyse der entsprechenden *cis*-Elemente mittels genomischer PCR³⁴.

Der Habilitant erlernte die Methode ChIP im Labor von Prof. Mark Ptashne (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA), welcher als einer der ersten Wissenschaftler genomische *real-time PCR* im Rahmen der ChIP verwendete, um die Rekrutierung von TFs quantifizieren zu können⁴⁰.

Im Rahmen unseres ChIP-Protokolls ist die Verwendung von multiplen Kontrollen essentiell. So dienen Immunopräzipitationen (IP) beispielsweise gegen die Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2), das FLAG-*tag* und/ oder das *green fluorescent protein* (GFP) als Negativkontrollen. Im Rahmen der genomischen *real-time PCR* werden genomische DNA und das sog. *total* (= *input*; genomische DNA nach der Sonifikation jedoch ohne IP) als Positivkontrollen bezüglich des *template* verwendet. Weiterhin werden Positiv- (Startpunktbereich des *housekeeping*-Gens ECE-1c) und Negativkontrollen (intergenetische Regionen, *upstream*-Promotorregionen) bezüglich der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren verwendet. Die Standardisierungen erfolgen u.a. mittels genomischer ChIP-PCR gegen den transkriptionellen Startpunktbereich von β -Aktin. Wie im Supplement der [Originalarbeit 14.1](#) beschrieben, quantifizieren wir die Rekrutierung eines Transkriptionsfaktors (hier: PLZF) an eine Promotorregion (hier: Renin-/ Prorenin-Rezeptor (RER)) folgendermaßen:

$$X = \frac{2^{-[Ct(IP(PLZF), PCR(RER)) - Ct(input, PCR(RER))]} }{2^{-[Ct(IP(TBP), PCR(\beta-actin)) - Ct(input, PCR(\beta-actin))]}}$$

Dabei wird die Rekrutierung des TBP an die *TATA box*-Region des β -Aktin-Promotors zur Standardisierung verwendet. *Ct*: *Cycle threshold* der *real-time PCR*; IP(y): y ist das Antigen, gegen welches sich der in der Immunopräzipitation verwendete Antikörper richtet. X kennzeichnet den Stimulationszustand der verwendeten Zellen, wobei beispielsweise der Quotient von X_1 (hier: unter Renininkubation) und X_2 (hier: Vehikelkontrolle) die relative Rekrutierung des Transkriptionsfaktors (hier: PLZF) quantifiziert.

Schließlich werden - wie im Supplement der [Originalarbeit 14.1](#) ausführlich beschrieben - auch die Negativkontrollen quantitativ bewertet, wobei beispielsweise die *Ct*-Wert-Differenz zwischen $Ct[IP(MMP-2), PCR(RER)]$ und $Ct[IP(PLZF), PCR(RER)]$ mindestens 3 betragen sollte.

2.2 Eigene Arbeiten - Real-time PCR-Datenanalyse mit der GED-Formel

Real-time PCR stellt derzeit eine der wichtigsten Methoden zur Quantifizierung von mRNA dar. Die exakte Messung von mRNA-Spiegeln, z.B. in Abhängigkeit von Genotyp bzw. Zellkulturbedingung, stellt auch im Bereich der Genregulation eine notwendige Bedingung für valide Aussagen dar. Wir konnten kürzlich eine neue Formel zur Auswertung von *real-time PCR*-Daten mathematisch herleiten und experimentell validieren. Diese sog. GED (*Gene Expression's CT Difference*)-Formel berücksichtigt u.a. die Effizienz der PCR-Amplifikation und ist nicht vom Mitführen einer Standardkurve abhängig ([Originalarbeit 14.2](#)). Die Berücksichtigung der Amplifikationseffizienz ist insofern von Bedeutung, da die falsche Annahme einer Verdoppelung der Produkte mit jedem Zyklus, d.h. einer Effizienz von 100%, zur Überschätzung, Unterschätzung und - bei heterogenen Effizienzen - sogar zu einem "Vorzeichenwechsel" der Genexpression führen kann. "Vorzeichenwechsel" meint in diesem Kontext, dass beispielsweise in einer Probe eine Herunterregulation relativ zu einer anderen Probe gemessen wird, obwohl in Wirklichkeit eine Hochregulation der genspezifischen mRNA-Spiegel vorliegt.

3. Endothelinsystem

3.1 Das Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 (ECE-1)

Das im Jahre 1988 entdeckte Endothelinsystem^{41, 42, 43} (Abbildung 3.1-1) besteht aus den drei, durch separate Gene kodierten Isopeptiden Endothelin-1 (ET-1), ET-2 und ET-3. Diese biologisch aktiven Endotheline werden in einem letzten spezifischen Syntheseschritt aus noch inaktiven Vorläuferpeptiden, den *big endothelins*, durch membrangebundene Metalloproteasen, die Endothelin-Konvertierungsenzyme (ECEs, *endothelin-converting enzymes*), generiert. Die ECEs sind deshalb als Schlüsselenzyme in der Biosynthese der Endotheline anzusehen. Bisher konnten zwei ECEs kloniert werden: ECE-1 stellt quantitativ die Hauptform dar und wird vor allem in Endothelzellen, aber auch in glatten Muskelzellen, Neuronen und Astrozyten exprimiert^{44, 45, 46, 47, 48}. Demgegenüber zeichnet sich ECE-2 durch ein spezifischeres, vorwiegend neuronales Expressionsmuster aus, wobei die zerebrale ECE-2-Expression geringer zu sein scheint als die von ECE-1⁴⁹.

Die Effekte der Endotheline werden bei Vertebraten über die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptorsubtypen ET_A und ET_B vermittelt. Die Wirkungen der Endotheline umfassen starke Vasokonstriktion (via ET_A), aber auch Vasodilatation (via ET_B), sowie mitogene Effekte, beispielsweise auf glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Mesangialzellen und Astrozyten^{50, 51, 52, 53}.

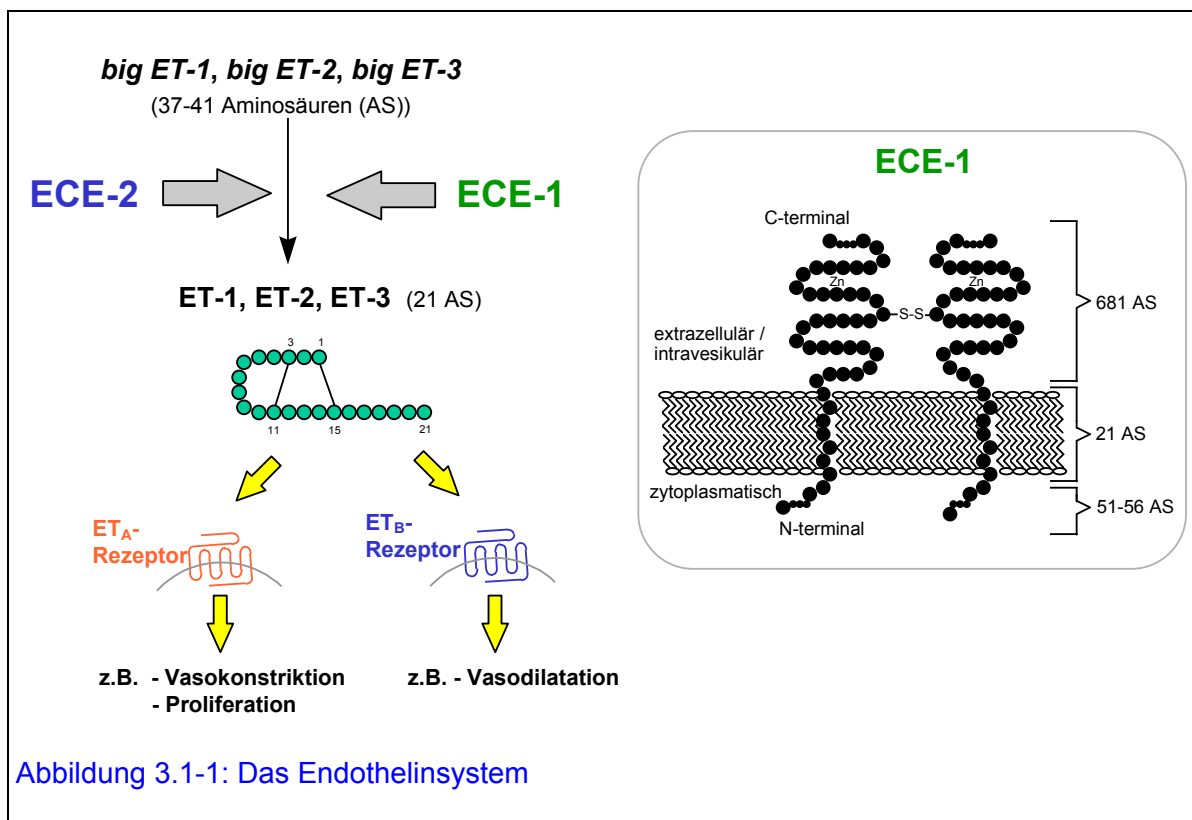


Abbildung 3.1-1: Das Endothelinsystem

ECE-1-Isoformen und deren alternative Promotoren

Das humane ECE-1 selbst wird wiederum in vier verschiedenen Isoformen exprimiert, die als ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d bezeichnet werden^{54, 55, 56, 57} und ähnliche Enzymkinetik, jedoch unterschiedliche Gewebeverteilung^{48, 58} sowie unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen^{56, 59} aufweisen. Diese Komplexität kann durch eine Heterodimerisierung von ECE-1-Isoformen weiter gesteigert werden⁶⁰.

Interessanterweise werden diese vier Isoformen durch alternative, isoformenspezifische Promotoren und nicht durch differentielles *splicing* eines gemeinsamen primären Transkriptes generiert (Abbildung 3.1-2)^{48, 57, 58, 61}.

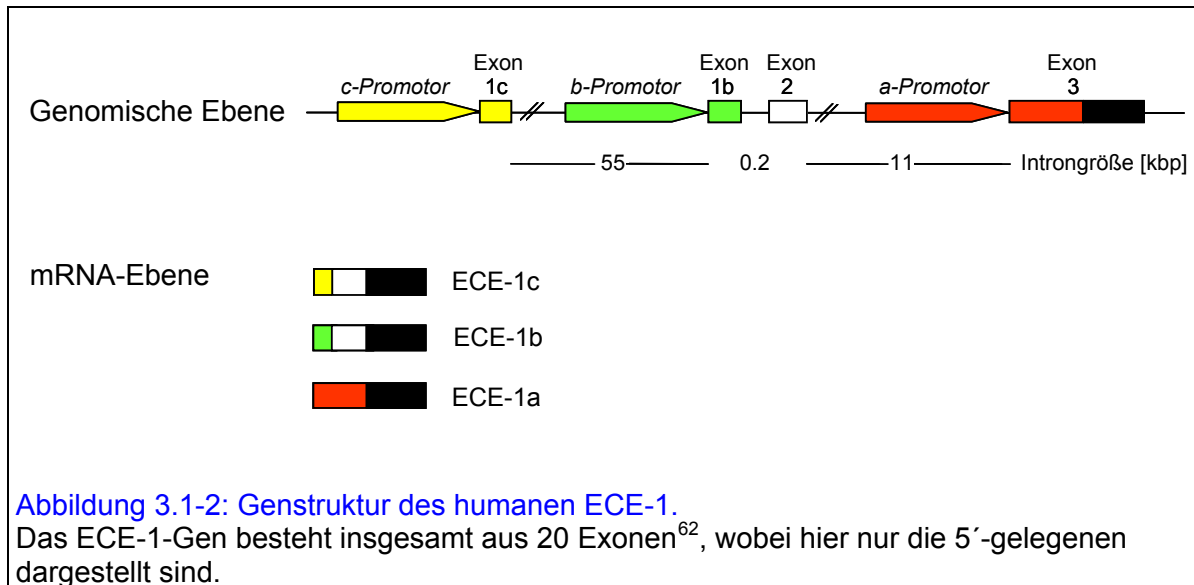


Abbildung 3.1-2: Genstruktur des humanen ECE-1.

Das ECE-1-Gen besteht insgesamt aus 20 Exonen⁶², wobei hier nur die 5'-gelegenen dargestellt sind.

Pathophysiologische Bedeutung des ECE-1

ECE-1 ist ein pathogenetischer Faktor bei einer Reihe von adulten kardiovaskulären Erkrankungen des Menschen, wie zum Beispiel arterieller Hypertonie⁶³, Arteriosklerose⁶⁴ und durch Ischämie bedingter Herzinsuffizienz⁶⁵. Im Tiermodell konnte eine erhöhte ECE-1-Aktivität, sowie eine vermehrte ECE-1a-mRNA-Expression bei Herzinsuffizienz demonstriert werden, was in Einklang mit der Bedeutung des Endothelinsystems bei dieser Erkrankung steht⁶⁶. Darüber hinaus ist die ECE-1-Expression bei der Restenose nach Angioplastie erhöht⁶⁷ sowie bei fibrotischen Erkrankungen von Leber⁶⁸ und Lunge⁶⁹ verändert. Weiterhin konnte im Tiermodell durch eine pharmakologische ECE-1-Blockade der klinisch bedeutsame Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung reduziert werden^{70, 71}. Zudem wurde in humanen malignen Gliomen eine vermehrte ECE-1 Expression nachgewiesen⁷².

Die Bedeutung von ECE-1 geht über die des eigentlichen Endothelinsystems hinaus, da ECE-1 nicht nur *big ETs* spaltet und so aktiviert, sondern eine breitere Substratspezifität aufweist, welche unter anderem auch Neurotensin und Substanz P umfasst⁷³.

Von Relevanz ist auch die Rolle von ECE bei Morbus Alzheimer. So kann ECE-1 β -Amyloid (A β) *in vitro* degradieren⁷⁴; weiterhin weisen ECE-1- und ECE-2-*knockout*-Mäuse eine erhöhte Konzentration von A β 40 und A β 42 auf⁷⁵, was mit der beobachteten Erniedrigung des Endothelin-Liquorspiegels bei Patienten mit M. Alzheimer⁷⁶ konsistent ist. Schließlich konnte kürzlich von einer französischen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein von uns erstmalig beschriebener ECE-1b-Promotorpolymorphismus⁷⁷ (s. Abschnitt 6.2) signifikant mit Morbus Alzheimer beim Menschen assoziiert ist, und zwar in einer ähnlichen Größenordnung wie das ApoE2-Allel⁷⁸.

3.2 Eigene Arbeiten - Klonierungen und funktionelle Charakterisierungen der isoformspezifischen Promotoren des ECE-1

Das ECE-1-Gen stellt aufgrund seiner entwicklungsbiologischen (s. Abschnitt 3.3) und pathophysiologischen Bedeutung einen Schwerpunkt der hier dargestellten Forschungstätigkeit dar. Weiterhin ist es aufgrund seiner komplexen Struktur mit multiplen Isoformen auch hervorragend geeignet, um allgemeine genregulatorische Prozesse zu untersuchen.

Drei der vier isoformspezifischen Promotoren des humanen ECE-1 sowie der bovine ECE-1a-Promotor wurden von uns kloniert und funktionell inklusive der Analyse transkriptioneller Startpunkte charakterisiert ([Originalarbeiten 14.3](#) sowie ^{79, 80, 81, 82, 83}). Die genregulatorischen Mechanismen wurden hierbei mit einer Vielzahl an Methoden untersucht [u.a. Promotor-Luziferase-Reporterassays mit seriellen Deletionsmutanten und *site-directed mutagenesis*, Kotransfektionsexperimente rekombinanter Transkriptionsfaktoren, *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs) mit *supershift-Analyse*, 5'-RACE, *RNase protection assay* (RPA)].

Die Isoformen ECE-1a, ECE-1b und ECE-1c werden insbesondere transkriptionell auf Promotorebene reguliert. Dies konnten wir unter anderem dadurch zeigen, dass eine Korrelation zwischen isoformspezifischen mRNA-Spiegeln und isoformspezifischen Promotoraktivitäten besteht.

Wir konnten zeigen, dass der ECE-1a-spezifische Promotor einen hohen Grad an Regulierbarkeit aufweist, während der ECE-1c-spezifische Promotor vor allem Eigenschaften eines *housekeeping*-Gens wie beispielsweise Fehlen einer *TATA box*, hoher Gehalt an CG-Dinukleotiden und Existenz von *cis*-Elementen für den Transkriptionsfaktor SP1 besitzt (vgl. Seite 2121 in [Originalarbeit 14.3](#)). Diese Promotorcharakteristika decken sich mit von uns durchgeführten mRNA-Expressionsanalysen, wobei ECE-1a im Gegensatz zur ubiquitären Expression von ECE-1c eine zell- bzw. gewebespezifischere Expression aufweist.

Der ECE-1a-Promotor kann beispielsweise durch Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie reguliert werden, wobei *upstream* der Proteinkinase C (PKC)-Signaltransduktionsweg involviert ist.

Im ECE-1c-Promotor konnten wir - in Übereinstimmung mit seinen *housekeeping*-Eigenschaften - multiple transkriptionelle Startpunkte determinieren, die jeweils mit bestimmten *cis*-Elementen (für Bindung des CAAT-*box*-bindenden Proteins NF-YB, für E2F-2 und für einen GC-*box*-bindenden Faktor) räumlich assoziiert waren (s.a. [Fig. 1 in Originalarbeit 14.3](#)). Im ECE-1c-Promotor konnten wir weiterhin nachweisen, dass die Konkurrenz zwischen einem konstitutiven Transkriptionsfaktors (NF-YB) und einem induzierbaren (GATA-2) um ein Promotorelement möglich ist ([Originalarbeit 14.3](#)).

3.3 Die Rolle des ECE-1 und des Transkriptionsfaktors Nkx2-5 im Rahmen der Herzentwicklung

ECE-1 ist nicht nur - wie oben beschrieben - bei verschiedenen, adulten Pathophysiologien beteiligt, sondern es übt auch wichtige Funktionen im Rahmen der Embryogenese aus. ECE-1-*knockout*-Mäuse weisen beispielsweise multiple kraniofaziale sowie kardiovaskuläre Fehlbildungen auf⁸⁴. Bezüglich des kardiovaskulären Phänotyps treten bei diesen Tieren sowohl konotrunkale Malformationen (beispielsweise perimembranöse Ventrikelseptumdefekte und sog. *double outlet right ventricle* (DORVs)) als auch Fehlbildungen der großen Gefäße (wie z.B. unterbrochene oder hypoplastische Aortenbögen) auf⁸⁴. Weiterhin sind die ECE-1-*knockouts* durch eine intestinale Aganglionose, analog zum Morbus Hirschsprung, sowie durch ein Fehlen von epidermalen Melanozyten gekennzeichnet⁸⁴. Daher vereinen diese Tiere die Phänotypen der ET-1-/ ET_A- (kraniofaziale und kardiovaskuläre Defekte)^{85, 86} bzw. ET-3-/ ET_B- (Defekte bezüglich Darmnervensystem und Melanozyten)^{87, 88} defizienten Mäuse (**Abbildung 3.3-1**), was auf die Schlüsselfunktion von ECE-1 bezüglich des gesamten Endothelinsystems hinweist⁸⁴. Darüber hinaus ist ECE-1 bei der Induktion von embryonalen Myozyten zu Purkinje-Fasern involviert⁸⁹.

Die Bedeutung von ECE-1 im Rahmen der menschlichen Ontogenese konnte durch die Beschreibung eines Patienten mit einer *loss-of-function*-Mutation im ECE-1-Gen demonstriert werden, dessen Klinik große Ähnlichkeiten zur ECE-1-*knockout*-Maus aufwies (beispielsweise multiple Herzfehler und M. Hirschsprung) und welcher zusätzlich noch Episoden schwerer Agitation zeigte⁹⁰.

Den oben beschriebenen entwicklungsbiologischen Defekten in den *knockout*-Modellen des Endothelinsystems liegt eine Störung von Proliferation, Migration und/ oder Differenzierung von Neuralleistenzellen zugrunde, wobei Neuralleistenzellen unter anderem Vorläufer für Neuronen des peripheren (enterischen) Nervensystems und für Melanoblasten darstellen, sowie an der Entwicklung von kardialem Konotrunkus, großen Gefäßen und Strukturen im Kiemenbogenbereich beteiligt sind^{84, 91, 92} (**Abbildung 3.3-1**).

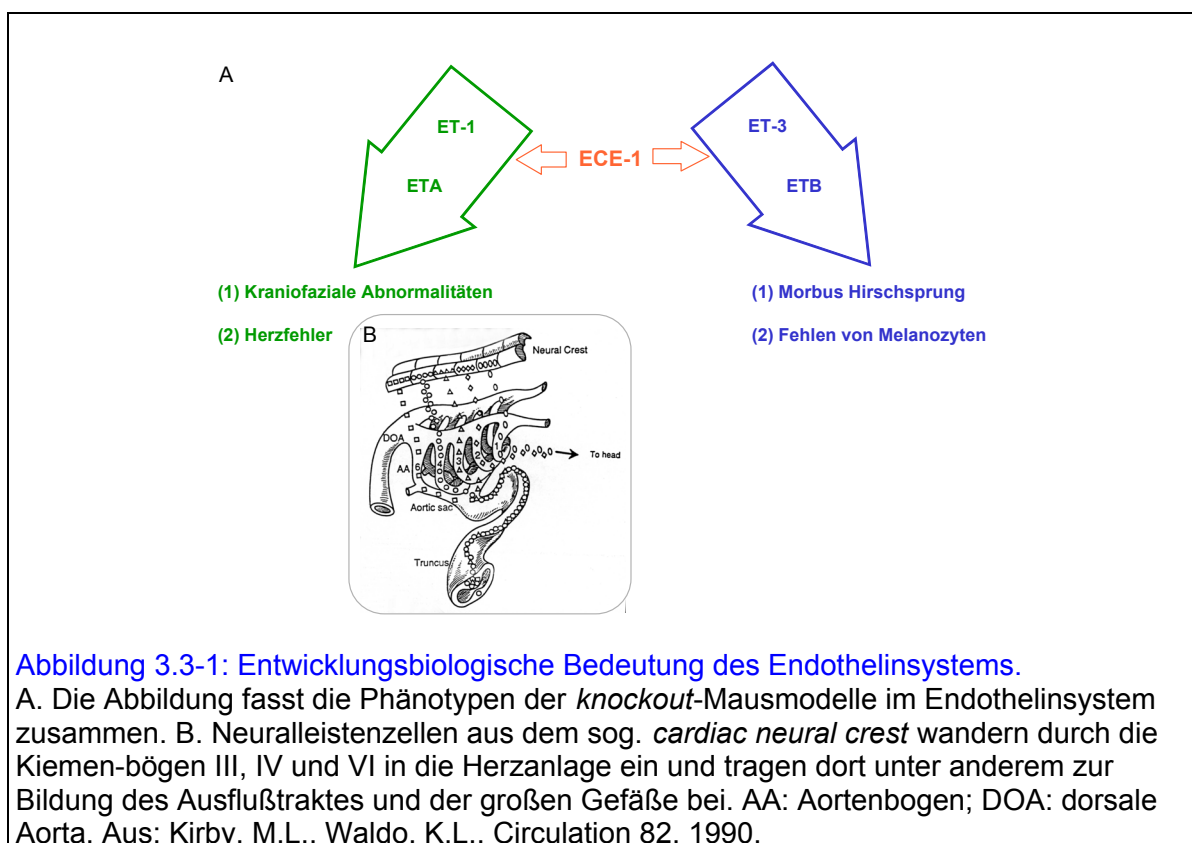
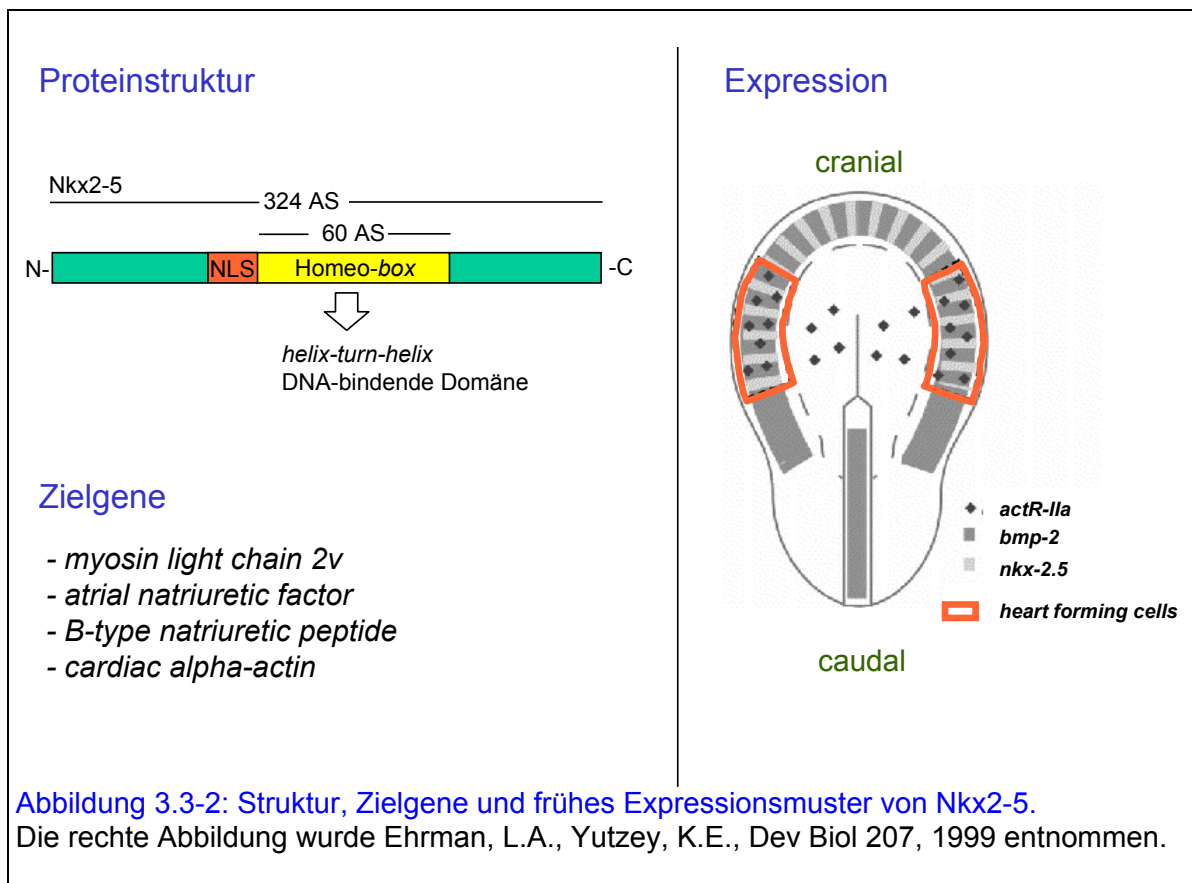


Abbildung 3.3-1: Entwicklungsbiologische Bedeutung des Endothelinsystems.

A. Die Abbildung fasst die Phänotypen der *knockout*-Mausmodelle im Endothelinsystem zusammen. B. Neuralleistenzellen aus dem sog. *cardiac neural crest* wandern durch die Kiemenbögen III, IV und VI in die Herzanlage ein und tragen dort unter anderem zur Bildung des Ausflußtraktes und der großen Gefäße bei. AA: Aortenbögen; DOA: dorsale Aorta. Aus: Kirby, M.L., Waldo, K.L., *Circulation* 82, 1990.

Der Transkriptionsfaktor Nkx2-5 zählt zur Familie der *homeo box*-Proteine und wird im präkardialen Mesoderm als einer der frühesten Marker der Kardiogenese exprimiert, wobei sein Expressionsmuster - neben dem des Activin-Typ IIa-Rezeptors und von *bone morphogenic protein-2* (BMP-2) - die sog. *heart forming region* definiert^{93, 94} (Abbildung 3.3-2). Nkx2-5-*knockout*-Mäuse sind durch ein Fehlen des sogenannten *cardiac looping*⁹⁵ bzw. einen Stillstand der Herzentwicklung nach dem *looping*⁹⁶ gekennzeichnet. Beim Menschen konnten unterschiedliche Nkx2-5-Mutationen beschrieben werden, welche beispielsweise mit konotrunkalen Herzfehlern (u.a. Ventrikelseptumdefekte, DORV und Fallot-Tetralogie), aber auch mit AV-Blöcken einhergehen^{97, 98, 99}.



3.4 Eigene Arbeiten - Regulation des ECE-1-Gens durch Nkx2-5

Aufgrund der Bedeutung sowohl von ECE-1 als auch von Nkx2-5 im Rahmen der Herzentwicklung bestand das Ziel eines Projektes darin, eine mögliche Regulation von ECE-1 durch Nkx2-5 zu untersuchen, um weitere Einblicke in die Pathomechanismen angeborener Herzfehler zu erhalten. Diese stellen mit 1% der Lebendgeburten^{100, 101} den häufigsten Geburtsdefekt dar und sind die führende, nicht-infektiöse Todesursache bei Kindern¹⁰².

Wir konnten in Kardiomyoblasten zeigen, dass eine Überexpression von Nkx2-5 alle drei isoformspezifischen ECE-1-Promotoren (ECE-1a, -1b und -1c) aktiviert (Originalarbeit 14.4). Mittels Gelshift sowie durch *site-directed mutagenesis* der entsprechenden Promotorkonstrukte konnte demonstriert werden, dass der ECE-1b-Promotor direkt, d.h. durch Bindung von Nkx2-5 an das entsprechende *cis*-Element aktiviert wird, während die beiden anderen ECE-1-Promotoren indirekt durch diesen Transkriptionsfaktor aktiviert werden (Originalarbeit 14.4; Abbildung 3.4-1A). In stabilen, Nkx2-5-überexprimierenden kardiomyoblastären und endothelialen Zelllinien wurde mittels *RNase protection assay* (RPA), *Northern blot* sowie *real-time PCR* nachgewiesen, dass Nkx2-5 auch im endogenen Chromatintext einen Anstieg der ECE-1a-, -1b- und -1c-spezifischen Transkripte bedingen kann (Originalarbeit 14.4).

Wir konnten somit erstmalig eine Verbindung zwischen dem kardialen Homeobox-Transkriptionsfaktor Nkx2-5 und dem kardial exprimierten ECE-1 aufzeigen (Originalarbeit 14.4). Unsere Daten legen nahe, dass die konotrunkalen Herzfehler, die bei bestimmten Nkx2-5-Mutationen beobachtet werden, unter anderem durch eine dysregulierte ECE-1-Expression vermittelt werden, und dass dieser Mechanismus auch die Defekte des Erregungsleitungssystems bei diesen Patienten erklären könnte (Abbildung 3.4-1B).

Die gezeigte Nkx2-5-ECE-1-Interaktion spielt unter Umständen auch in der adulten Pathophysiologie eine Rolle, da sowohl - wie unter 3.1. beschrieben - ECE-1 als auch Nkx2-5¹⁰³ bei Herzinsuffizienz hochreguliert sind, und eine Hochregulation des endogenen Nkx2-5 im Tiermodell mit Herzinsuffizienz assoziiert ist¹⁰⁴.

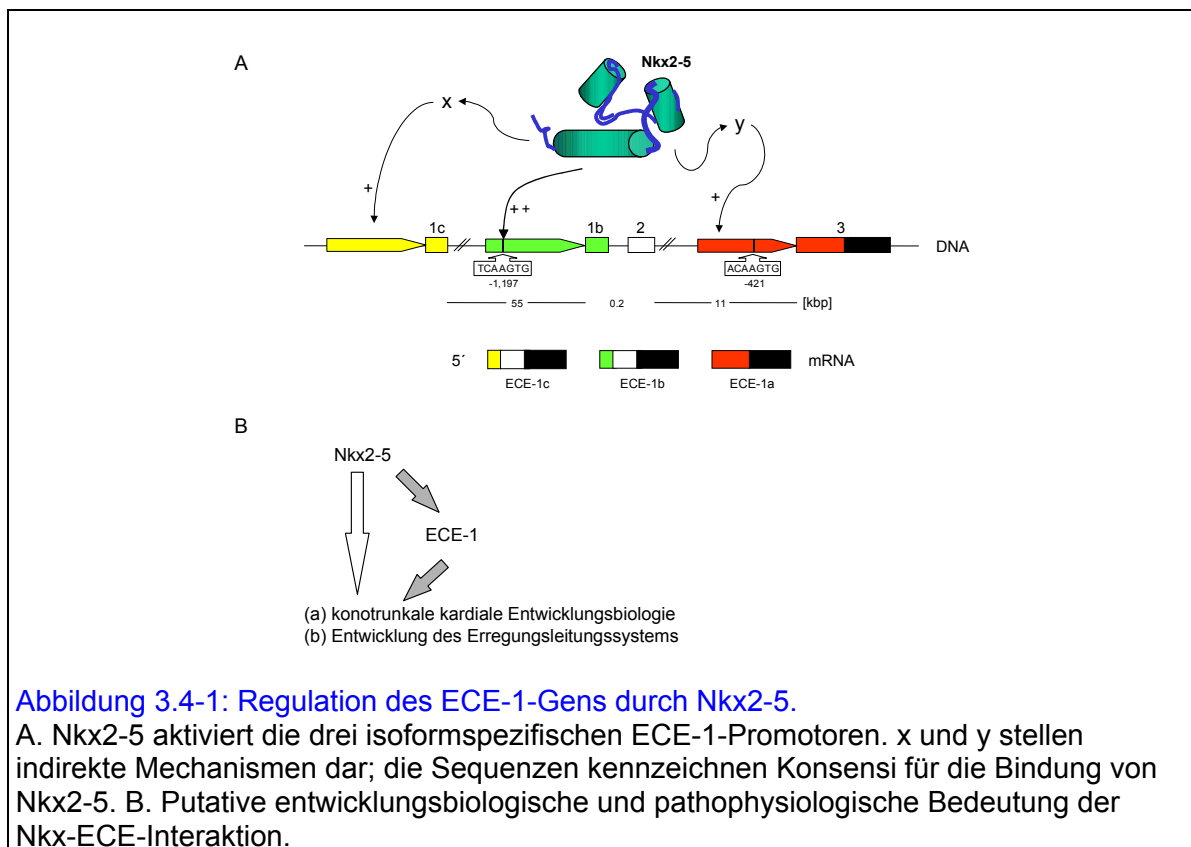


Abbildung 3.4-1: Regulation des ECE-1-Gens durch Nkx2-5.

A. Nkx2-5 aktiviert die drei isoformspezifischen ECE-1-Promotoren. x und y stellen indirekte Mechanismen dar; die Sequenzen kennzeichnen Konsensi für die Bindung von Nkx2-5. B. Putative entwicklungsbiologische und pathophysiologische Bedeutung der Nkx-ECE-Interaktion.

4. Renin-Angiotensin-System

4.1 Der AT2-Rezeptor (AT2R)

Das Renin-Angiotensin-System (RAS), welches insbesondere aus den in [Abbildung 4.1-1A](#) gezeigten Komponenten besteht, übt Schlüsselfunktionen im Bereich der Kreislaufregulation und Flüssigkeitshomöostase aus^{105, 106}. Die Effekte des RAS werden hauptsächlich über die beiden Rezeptoren Angiotensin-AT1-Rezeptor (AT1R) und Angiotensin-AT2-Rezeptor (AT2R) vermittelt. Während eine Aktivierung des AT1R insbesondere Vasokonstriktion, zelluläre Hypertrophie (z.B. von Kardiomyozyten), Proliferation (u.a. von Fibroblasten, Mesangialzellen, glatten Gefäßmuskelzellen) und Fibrose bedingt, kommt dem AT2R bezüglich dieser Effekte eine antagonistische Wirkung zu ([Abbildung 4.1-1A](#))^{105, 107, 108, 109}. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu betonen, dass die Funktion des AT2R in der Literatur kontrovers diskutiert wird¹¹⁰, da einige *in vitro*- und *in vivo*-Befunde zeigen konnten, dass AT2R-Aktivierung auch Fibrose und Wachstum fördern kann^{111, 112, 113}.

Angiotensin II ist ein wichtiger pathogenetischer Faktor bei einer Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. der Atherosklerose^{114, 115}, dem Schlaganfall^{116, 117}, renalen Endorganschäden^{118, 119} und sog. *remodeling*-Prozessen nach Myokardinfarkt^{120, 121}. Darüber hinaus konnte eine Vielzahl von klinischen Studien demonstrieren, dass eine Blockade des RAS durch ACE-Hemmer oder Angiotensin-AT1-Rezeptorblocker (ARBs) die Progression von Herzinsuffizienz und renalen Erkrankungen (z.B. der diabetischen Nephropathie) verlangsamen und die Mortalität reduzieren kann^{122, 123}.

Der zuvor erwähnte AT2R ist auch insofern von pharmakologischer Bedeutung, als eine Blockade des AT1R mit ARBs indirekt eine Aktivierung des AT2R zu bedingen scheint^{124, 110, 125}. Eine Aktivierung des AT2R ist unter anderem mit einer Hemmung von MAP-Kinasen - und damit antiproliferativen Effekten⁻¹²⁶, einer Hemmung der JAK-STAT-Kaskade - und damit antiinflammatorischen Effekten⁻¹¹⁰, sowie einer verstärkten Bradykinin-NO-Signaltransduktion - und damit vasodilatativen Effekten⁻¹²⁷ assoziiert.

Um die Signaltransduktionskaskaden des AT2R detailliert zu analysieren, ist es notwendig, direkte Proteininteraktionspartner dieses Rezeptors zu identifizieren. Derzeit kennt man folgende Adapterproteine des AT2R ([Abbildung 4.1-1B](#)):

- Im Jahre 1996 konnte gezeigt werden, dass der AT2R an die G-Proteine $G\alpha_i2$ und $G\alpha_i3$ koppelt¹²⁸. G-Proteine scheinen jedoch eine atypische Funktion im Rahmen der AT2R-Signaltransduktion auszuüben, da Bindung von Angiotensin II an diesen Rezeptor nicht durch G-Protein-Bindung beeinflusst wird^{129, 130}.
- Der AT2R kann weiterhin mit der Phosphatase (SHP-1)¹³¹ physikalisch interagieren.
- Vor wenigen Jahren wurde der Transkriptionsfaktor PLZF (*promyelocytic zinc finger protein*) im kardialen Kontext als weiterer, direkter Interaktionspartner des AT2R beschrieben¹³².
- ATBP, ein von unserer Arbeitsgruppe erstmalig identifizierter AT2R-Bindungspartner, wird im folgenden Abschnitt 4.2 diskutiert werden.

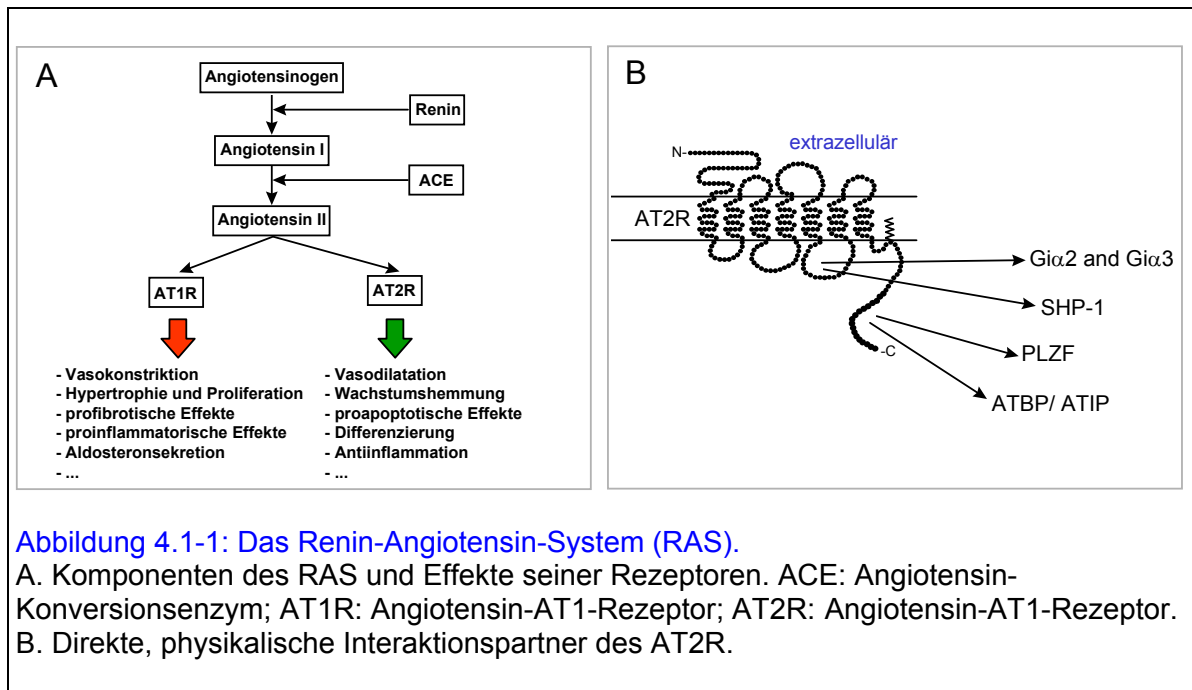


Abbildung 4.1-1: Das Renin-Angiotensin-System (RAS).

A. Komponenten des RAS und Effekte seiner Rezeptoren. ACE: Angiotensin-Konversionsenzym; AT1R: Angiotensin-AT1-Rezeptor; AT2R: Angiotensin-AT1-Rezeptor. B. Direkte, physikalische Interaktionspartner des AT2R.

4.2 Eigene Arbeiten - Klonierung und funktionelle Charakterisierung des ATBP

Da der AT2R wie zuvor beschrieben unterschiedliche, teilweise entgegengesetzte zelluläre Effekte ausüben kann und da eine detaillierte Analyse von Signaltransduktionsprozessen unter anderem auf der Charakterisierung von physikalischen Interaktionen beruhen sollte, bestand das Ziel des in diesem Abschnitts dargestellten Projektes darin, weitere, unbekannte, direkte Interaktionspartner des AT2R zu identifizieren.

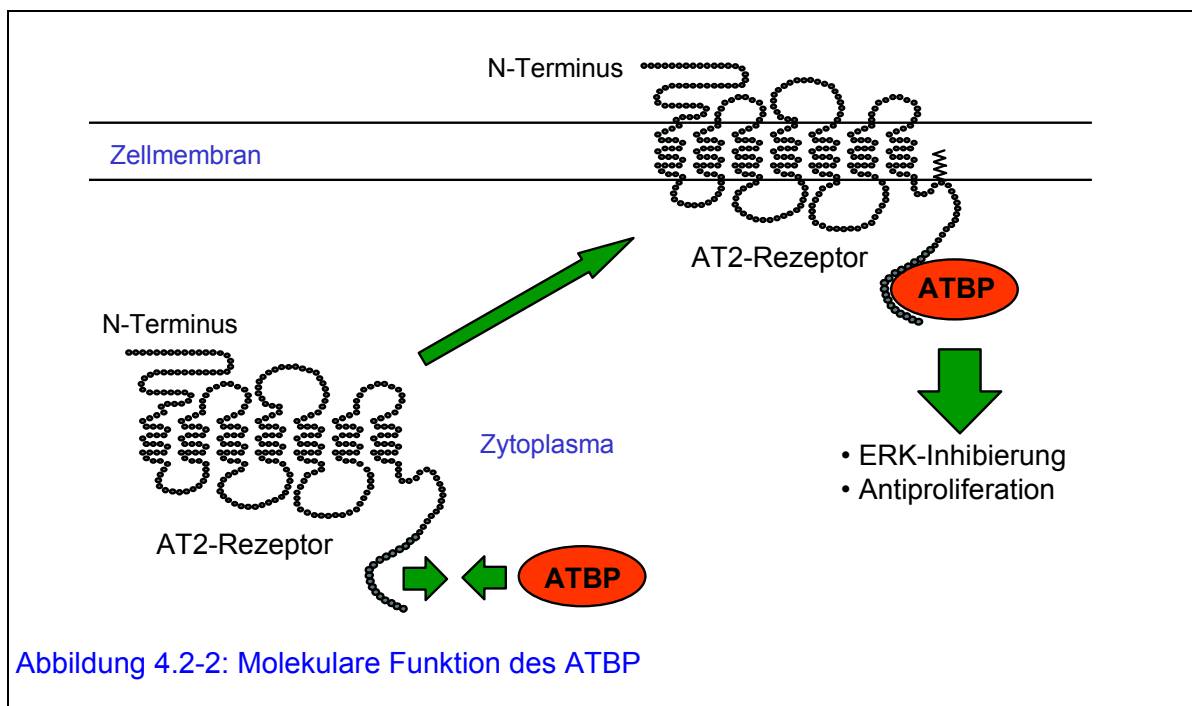
Wir konnten unter Verwendung eines *yeast two-hybrid screenings* einer Mausbibliothek ATBP (*AT2R binding protein*) als ein zuvor unbekanntes Protein klonieren, welches an den zytoplasmatischen C-Terminus des Angiotensin-AT2 Rezeptors bindet¹³³. Darüber hinaus konnte die Interaktion zwischen AT2R und ATBP mittels Immunopräzipitation verifiziert werden. ATBP wird in mindestens drei verschiedenen Isoformen (ATBP50, ATBP60 und ATBP135) exprimiert, wobei ATBP insgesamt ein ubiquitäres Expressionsmuster aufweist¹³³. ATBP spielt eine entscheidende Rolle beim Transport des AT2R vom Golgi-Apparat zur Zytoplasmamembran, da eine Herunterregulation von ATBP mittels siRNA eine Retention des AT2R in intrazellulären Kompartimenten bedingt¹³³ (Abbildung 4.2-2). Weiterhin ist ATBP in Neuroblastomzellen für die AT2R-vermittelte Hemmung von MAP-Kinasen und die AT2R-vermittelte Proliferationshemmung notwendig¹³³ (Abbildung 4.2-2).

In PC12W-Phäochromozytom-Zellen, welche den AT2- aber nicht den AT1-Rezeptor exprimieren, wird nach Stimulation mit Angiotensin II die mRNA von ATBP stark induziert. Weiterhin ist ATBP50-mRNA in AT2R-*knockout*-Mäusen vermindert exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass der AT2R im Sinne eines positiven *feedbacks* den mRNA-Spiegel des ATBP erhöht¹³³.

Schließlich konnten wir zeigen, dass der AT2R - der allgemein in fetalen Geweben ein breites und postnatal ein begrenztes (z.B. Gehirn, Herz, Niere, Uterus und Ovar) Expressionsmuster aufweist^{105, 134} - im Vergleich zu den ATBP-Isoformen in weniger Geweben exprimiert wird¹³³. Dies weist auf eine über die eines Effektormoleküls des AT2R hinausreichende Funktion des ATBP hin.

Unsere Ergebnisse konnten dadurch bestätigt werden, dass das humane ATBP-Gen, welches in dieser Spezies als ATIP (*AT2 receptor interacting protein*) bezeichnet wird, von einer französischen Gruppe kloniert werden konnte¹³⁵. Auch diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ATIP eine Inhibierung der Wachstumsfaktor-induzierten ERK2-Aktivierung vermittelt und einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation besitzt.

Unsere Daten bieten darüber hinaus eine mögliche Erklärung für die kontrovers diskutierte Rolle des AT2R (s. Abschnitt 4.1). Dieser Rezeptor *per se* ist weder eindeutig als "gut" noch als "böse" im Hinblick auf kardiovaskuläre Pathophysiologie anzusehen, sondern höchstwahrscheinlich bestimmt die Art des rekrutierten Adapterproteins die Rezeptorfunktion. Rekrutierung von SHP-1 oder ATBP vermittelt beispielsweise antiproliferative und antihypertrophische Effekte, während eine Rekrutierung von PLZF kardiale Hypertrophie fördert (Funke-Kaiser et al., 2006¹²⁴).



4.3 Der Renin-/ Prorenin-Rezeptor (RER)

Die Protease Renin stellt aufgrund der Fähigkeit, die Hydrolyse von Angiotensinogen zu Angiotensin I zu katalysieren, ein Schlüsselenzym im Renin-Angiotensin-System (RAS) dar^{136, 137}. Renin und Prorenin werden klassischerweise als Enzyme bzw. Proenzyme betrachtet. Neuere Forschungen zeigen jedoch, dass diese Proteine auch Hormonfunktion besitzen, da sie an zelluläre Zielstrukturen binden können¹³⁸. Weiterhin wurde kürzlich ein humaner Renin-/ Prorenin-Rezeptor (RER) kloniert, welcher spezifisch Renin und auch Prorenin binden kann. Der RER besitzt eine singuläre Transmembrandomäne und übt interessanterweise eine duale Funktion aus^{139, 140} (Abbildung 4.3-1):

(1) Bindung von Renin an diesen Rezeptor steigert die katalytische Aktivität des Renins um den Faktor 4 bis 5. Darüber hinaus bedingt Rezeptorbindung von Prorenin, dass dessen katalytische Aktivität - bezüglich der Generierung von Angiotensin I - demaskiert wird.

(2) Nach Ligandenbindung kann der Renin-/ Prorenin-Rezeptor eine Signaltransduktionskaskade induzieren. Bindung von Renin und auch Prorenin bedingt eine Phosphorylierung des Rezeptors sowie eine Aktivierung der MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen (MAPK) ERK1 and ERK2.

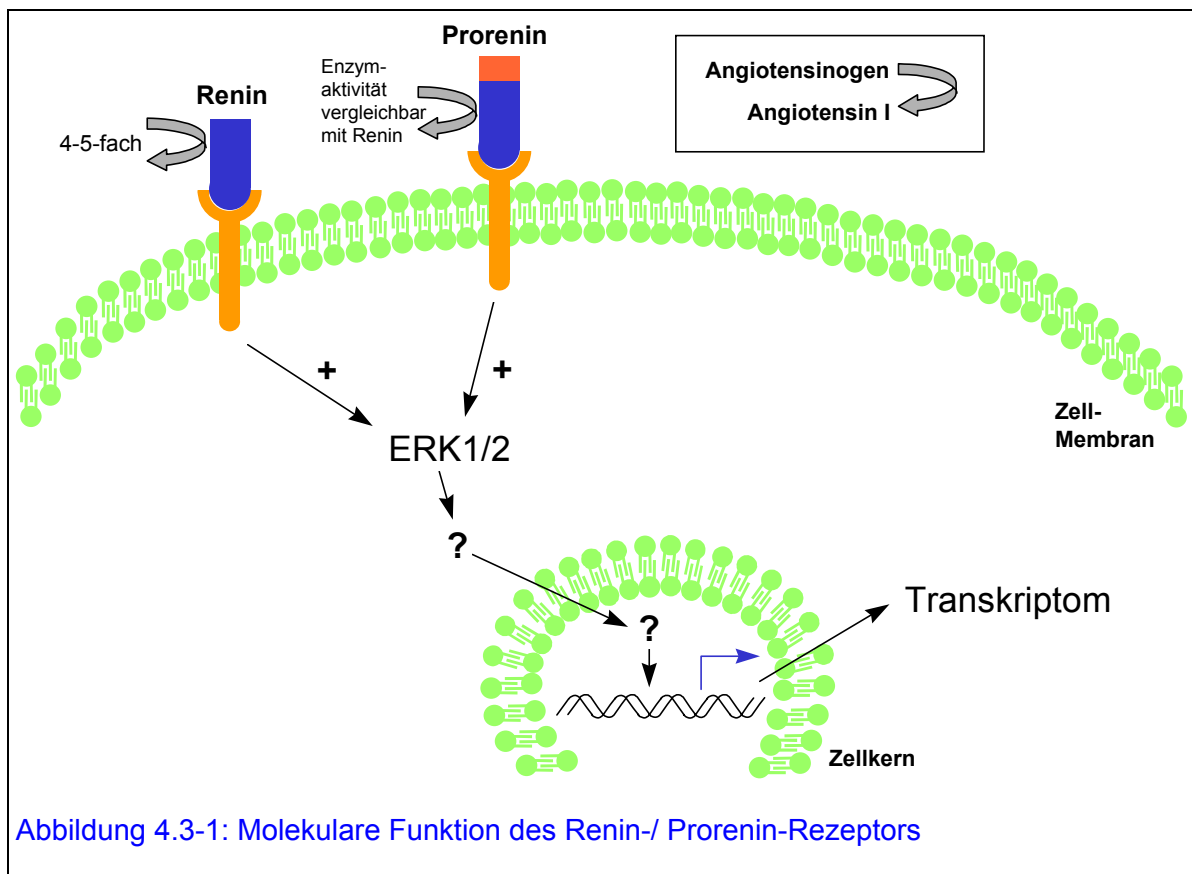


Abbildung 4.3-1: Molekulare Funktion des Renin-/ Prorenin-Rezeptors

Die mRNA des RER wird vor allem in Hirn, Herz, Plazenta, Niere, Leber und Pankreas exprimiert^{139, 140}.

Weiterhin ist zu betonen, dass der C-terminale Abschnitt des RER molekular identisch ist mit dem *vacuolar proton-translocating ATPase (V-ATPase) membrane sector-associated protein M8-9 (APT6M8-9)*^{141, 140}. Dies ist insofern von Bedeutung, da V-ATPasen beispielsweise bezüglich zahlreicher renaler Transportprozesse, dem *receptor recycling* und der Neurotransmitterspeicherung physiologische Funktionen ausüben¹⁴².

Medizinische Bedeutung des Renin-/ Prorenin-Rezeptors

(1) Monogene Erkrankungen:

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein monogener Gendefekt im Renin-/ Prorenin-Rezeptor die Ursache für eine *X-linked mental retardation* (XLMR) - verbunden mit Epilepsie (XMRE) - in einer betroffenen Familie ist¹⁴³. Passend zu diesen Befunden konnte nachgewiesen werden, dass das vom RER (= APT6M8-9)-Genlokus kodierte Protein eine entscheidende Rolle im Rahmen der Entwicklung des zentralen Nervensystems spielt, da die Deletion von APT6M8-9 beim Zebrafisch mit verkleinertem Enzephalon und Nekrosen des ZNS verbunden ist¹⁴⁴.

(2) Kardiovaskuläre Erkrankungen:

Sog. *decoy*-Peptide, welche die rezeptorassoziierte Prorenin-Aktivierung bzw. Bindung inhibieren, können im Tierversuch die Entwicklung und Progression einer hypertoniebedingten, kardialen Fibrose reduzieren^{145, 146}, und darüber hinaus eine diabetische Nephropathie komplett hemmen^{147, 148}. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass eine RER-Aktivierung das profibrotische Zytokin TGF- β in Mesangialzellen induzieren kann¹⁴⁹. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle des RER in der Pathophysiologie dieser Endorganschäden hin. Weiterhin konnte kürzlich demonstriert werden, dass eine transgene Überexpression des RER arterielle Hypertonie¹⁵⁰ sowie eine Glomerulosklerose¹⁵¹ bedingt.

(3) Pharmakologie:

Aufgrund der Entwicklung oral wirksamer Renin-Inhibitoren wie Ro 66-1132 (Hoffmann-La Roche) oder Aliskiren (CGP 60536B, SPP-100; Novartis)^{137, 152}, wobei letzteres bezüglich der Indikation arterielle Hypertonie die klinische Phase III abgeschlossen^{152, 153, 154} und im März 2007 die Zulassung in den USA erhalten hat^{155, 156}, kommt dem Renin-/ Prorenin-Rezeptor eine wichtige Bedeutung in der Pharmakologie und kardiovaskulären klinischen Medizin zu. Renin-Inhibitoren reduzieren zwar wie erwartet die Plasmareninaktivität, aufgrund der Unterbrechung der negativen Rückkopplung von Angiotensin II auf die Renin-Synthese kommt es jedoch zu einem Anstieg der absoluten Plasmakonzentration von Renin um das bis zu 34-fache^{157, 158, 137}. Daher ist zu erwarten, dass diese neue Medikamentengruppe indirekt Auswirkungen auf die Signaltransduktion des RER aufweist, was weitere Wirkungen und Nebenwirkungen bedingen könnte.

(4) Onkologie:

Dem RER scheint aber auch eine Rolle in der Onkologie zuzukommen, da dieser in humanen Glioblastomen und Glioblastomzelllinien exprimiert wird, und der Renin-Inhibitor RO0663525 die DNA-Synthese und Zellzahl von Gliomzellen in Kultur reduzieren kann, wobei dieser Effekt über den RER vermittelt zu sein scheint¹⁵⁹.

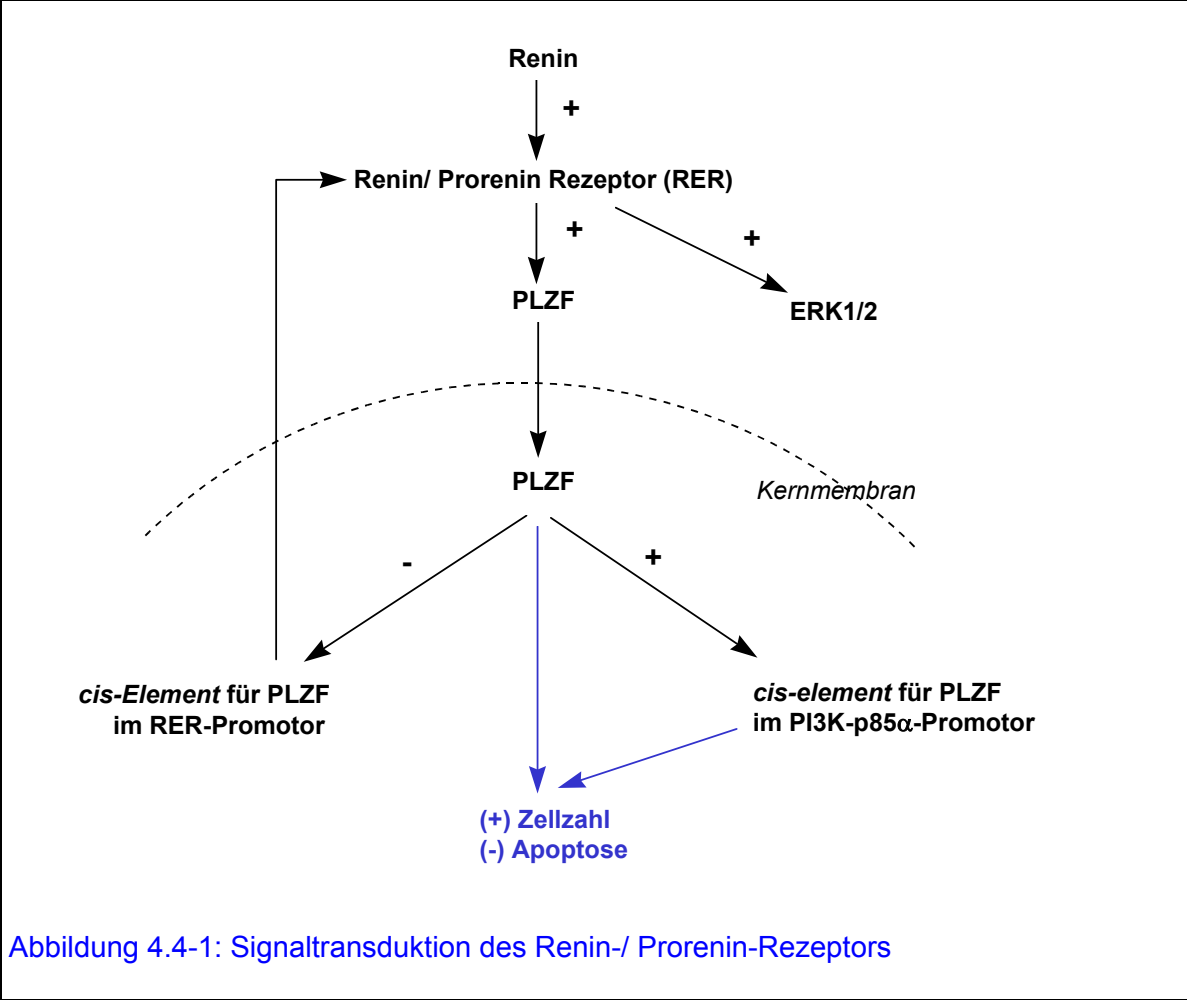
4.4 Eigene Arbeiten - Entschlüsselung der Signaltransduktion des RER

Da die Signaltransduktion des Renin-/ Prorenin-Rezeptors bis auf die oben erwähnte leichte Aktivierung von MAP-Kinasen zuvor noch nicht untersucht worden war und auch keine direkten Protein-Protein-Interaktionspartner des RER bekannt waren, bestand das Ziel eines kürzlich abgeschlossenen Projektes darin, die Signaltransduktion des RER von der Membran bis hinunter in den Zellkern basierend auf Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen zu analysieren ([Originalarbeit 14.1](#)).

Initial konnten wir mittels RT-PCR und *Northern blotting* nachweisen, dass der RER ubiquitär exprimiert wird. Darüber hinaus wurden die transkriptionellen Startpunkte des humanen RER mittels 5'-RACE analysiert, wobei multiple Startstellen in diesem *TATA box*-losen Promotor identifiziert werden konnten. Komplementär zur Startpunktanalyse wurde der Promotor des humanen RER Gens kloniert. Nachfolgende Promotor-Reporter-Gen-Assays zeigten, dass der RER-Promotor in unterschiedlichen Zellen eine sehr hohe Promotoraktivität aufweist ([Originalarbeit 14.1](#)). Die Promotor-Architektur des RER weist also - passend zur ubiquitären Expression - Kennzeichen eines sog. *housekeeping*-Promotors auf.

Anschließend konnten wir mittels eines *yeast two-hybrid screening* den Transkriptionsfaktor PLZF (*promyelocytic zinc finger protein*) als Interaktionspartner des RER identifizieren und diese Protein-Protein-Interaktion mittels Koimmunopräzipitation verifizieren ([Originalarbeit 14.1](#)). Bei PLZF handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher bei Patienten mit t(11;17)(q23;q21)-translokationsassoziiierter akuter promyelozytischer Leukämie (APL) disruptiert ist^{160, 161, 162}, und welchem eine Bedeutung im Rahmen der ZNS-Entwicklung zukommt^{163, 164}. Darüber hinaus wurde PLZF bereits als Adapterprotein des Angiotensin-AT2-Rezeptors im Herzen beschrieben¹⁶⁵ (s.a. Abschnitt 4.1). Weitere Experimente zeigten, dass eine Aktivierung des RER durch Renin eine Translokation von PLZF vom Zytoplasma in den Kern bedingt ([Originalarbeit 14.1](#); [Abbildung 4.4-1](#)). Mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP), *electrophoretic mobilityshift assay* (EMSA) und *site-directed mutagenesis* konnte nachgewiesen werden, dass PLZF direkt auf dem Promotor des RER bindet, was wiederum eine erniedrigte Promotoraktivität und einen erniedrigten mRNA-Spiegel des RER bedingte ([Originalarbeit 14.1](#)). Demgegenüber verursachte eine RER-Aktivierung PLZF-vermittelt eine Aktivierung der p85 α -Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K-p85 α) auf Promotor- und mRNA-Ebene ([Abbildung 4.4-1](#)). Alle diese Effekte konnten durch siRNA gegen den RER aufgehoben werden ([Originalarbeit 14.1](#)). Die Bedeutung dieser neuen Renin-RER-PLZF-RER/ PI3K-Signaltransduktionskaskade *in vivo* konnte von uns in einem PLZF-knockout-Modell der Maus verifiziert werden ([Originalarbeit 14.1](#)).

Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass eine Aktivierung dieses RER-PLZF-Signaltransduktionsweges in Kardiomyoblasten die Zellzahl erhöht und die Apoptose vermindert ([Originalarbeit 14.1](#)).



5. Prionen-Protein

5.1 Prionen und Prionenerkrankungen

Prionen sind proteinartige Partikel, welche trotz des Fehlens von Nukleinsäuren infektiös sind. Prionenerkrankungen stellen aufgrund dieser speziellen Pathophysiologie eine besondere Krankheitsgruppe innerhalb der Medizin dar.^{166, 167, 168, 169} Humane Prionenerkrankungen lassen sich in 1) genetische (M. Gerstmann-Sträußler¹⁷⁰ und fatale familiäre Insomnie¹⁷¹), 2) infektiöse (Kuru¹⁷² und die iatrogene Creutzfeld-Jakob-Krankheit¹⁷³ sowie die *new variant Creutzfeld-Jakob disease*¹⁷⁴) und 3) sporadische (Creutzfeld-Jakob-Krankheit¹⁶⁶) einteilen. All diesen Krankheiten gemeinsam ist, dass das endogene, physiologische Prionen-Protein (PrP^C) entweder mutiert ist oder durch infektiöses Prionen-Protein in die pathologische, partiell protease-resistente Form (PrP^{Sc}) missgefaltet wird¹⁷⁵. Übereinstimmend damit konnte gezeigt werden, dass PrP^C-defiziente Mäuse resistent gegenüber Prionenerkrankungen sind, das Vorhandensein von PrP^C also eine Voraussetzung für die Pathogenese von Prionenerkrankungen ist.^{176, 175, 177} Prionenerkrankungen werden darüber hinaus auch als pathophysiologisches Modell für M. Alzheimer genutzt^{178, 179, 180}, und Prionen spielen - unabhängig von den eigentlichen Prionenerkrankungen - in der Pathophysiologie dementieller Erkrankungen eine Rolle^{181, 182}. Die zum Teil kontrovers diskutierte physiologischen Funktionen von PrP^C umfassen Signaltransduktion^{183, 184}, Anti-Apoptose^{185, 186}, Kupferbindung^{184, 187} und oxidativen Stress-Metabolismus^{188, 189, 184}. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass PrP^C neben dem Gehirn beispielsweise auch in der Niere und im Herzen exprimiert wird^{190, 191, 192}. Bezüglich des letztgenannten Expressionsortes scheinen pathologische Prionen-Proteine eine Kardiomyopathie induzieren zu können^{193, 194}.

5.2. *Eigene Arbeiten* - Funktionelle Charakterisierung des Promotors des humanen Prionen-Proteins

Aufgrund der Bedeutung der PrP^C-Expression im Rahmen von Prionenerkrankungen, sowie aufgrund der allgemeinen physiologischen Bedeutung des Prionen-Proteins, bestand das Ziel eines Projektes darin, den humanen Promotor des PrP^C-kodierenden Gens (PRNP), welcher zu diesem Zeitpunkt noch nicht kloniert war, zu subklonieren und basal funktionell zu charakterisieren ([Originalarbeit 14.5](#)).

Initial konnten wir zeigen, dass die mRNA des endogenen Prionen-Proteins nicht nur in neuronalen, sondern auch in endothelialen Zellen exprimiert wird. Dieser endothelialen Expression scheint pathophysiologische Bedeutung zuzukommen, da Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen darauf hindeuten, dass gastrointestinale und zerebrale Gefäße bei der Neuroinvasion von Prionenerkrankungen beteiligt zu sein scheinen^{195, 196, 197}.

Weiterhin konnten unterschiedliche transkriptionelle Startpunkte in neuronalen *versus* endothelialen Zellen determiniert werden, was auf zellspezifische Mechanismen in der *core*-Promotor-Regulation hindeutet ([Originalarbeit 14.5](#)).

Der subklonierte PRNP-Promotor zeigte starke Aktivitäten - welche mittels der relativen Luziferaseaktivität (RLA) quantifiziert wurden - sowohl in humanen neuronalen als auch in humanen endothelialen Zellen. Mittels Analyse von seriellen Promotordeletionsmutanten konnten zwei aktivierende Regionen ([−131/−284]; [−1303/−1543] relativ zum 3'-Ende von Exon 1 in Basenpaaren) und zwei reprimierende Regionen ([−254/−567]; [−567/−909]) in neuronalen Zellen identifiziert werden. Demgegenüber sind die aktivierenden Elemente in endothelialen Zellen bei [−131/−284] und [−284/−567] lokalisiert, und es konnte nur eine einzige reprimierende Promotoregion ([−567/−909]) in diesem Zelltyp aufgezeigt werden ([Originalarbeit 14.5](#)). Diese Befunde deuten auf zellspezifische Mechanismen auch in der *proximalen* Promotor-Regulation hin.

6. Funktionelle Charakterisierungen von Promotorpolymorphismen

6.1 Eigene Arbeiten - Polymorphismen im Cathepsin G-Genpromotor

Cathepsin G (CTSG) ist eine Serin-Protease, welche von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird¹⁹⁸ sowie die Prostazyklinproduktion hemmen und unter anderem dadurch die Thrombozytenaggregation fördern^{199, 200} kann.

Im Rahmen eines sog. *ACE-independent pathways* kann Cathepsin G beispielsweise in Granulozyten und im Gehirn Angiotensin II aus Angiotensin I generieren^{201, 202}. Darüber hinaus besitzt Cathepsin G die Fähigkeit, die Reaktion von Angiotensinogen zu Angiotensin I zu katalysieren^{203, 202}. Dem RAS wiederum kommt eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und der intravaskulären Thrombose zu²⁰⁴.

Aufgrund dieser pathophysiologischen Bedeutung von Cathepsin G wurde von uns das humane CTSG-Gen hinsichtlich der Existenz von möglichen genetischen Polymorphismen untersucht²⁰⁵. Wir konnten insgesamt 5 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) identifizieren, von welchen vier in der Promotorregion des Gens lokalisiert waren (G-618C, G-315A, C-179T und C-160T). Basierend auf diesen Befunden wurden die Teilnehmer zweier Fall-Kontroll-Studien [(1) ECTIM-Studie mit 900 Herzinfarktpatienten und 900 Kontrollen; (2) GENIC-Studie mit 466 Apoplex-Patienten und 444 Kontrollen] bezüglich der CTSG-Polymorphismen genotypisiert²⁰⁵. In keiner der beiden Studien konnten die Promotorpolymorphismen jedoch mit einem Phänotyp assoziiert werden.

Komplementär dazu wurden von uns die entsprechenden Promotor-Haplotypen in Luziferase-Reporter-Plasmide kloniert und in eine humane, histiozytäre Lymphomzelllinie transfiziert. Überstimmend mit den klinischen Befunden zeigte sich kein Effekt der Cathepsin-G-Promotorpolymorphismen auf die Promotoraktivität²⁰⁵.

6.2 Eigene Arbeiten - Polymorphismen im ECE-1b-Genpromotor

In einer größeren (n= 704) Assoziationsstudie konnten wir zwei ECE-1b Promotorpolymorphismen (T-839G und C-338A; [Abbildung 6.2-1](#)) identifizieren, die signifikant mit essentieller arterieller Hypertonie bei Frauen assoziiert waren, wobei abhängig vom Genotyp systolische Blutdruckunterschiede von bis zu 14 mmHg beobachtet werden konnten ([Originalarbeit 14.6](#)). Darüber hinaus konnten wir funktionell zeigen, dass einer dieser hypertonusassoziierten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des ECE-1b Promotors, welcher sich im Bereich einer Konsensussequenz für die Transkriptionsfaktorfamilie E2F befindet (C-338A), mit veränderter Promotor-Reporteraktivität und veränderter Affinität für den Transkriptionsfaktor E2F-2 verbunden ist, wobei das -338A-Allel eine erhöhte Affinität und eine erhöhte Promotoraktivität bedingt ([Originalarbeit 14.6](#)).

Die E2F-Transkriptionsfaktorfamilie umfasst die 6 Transkriptionsfaktoren E2F-1 bis E2F-6 und übt eine Schlüsselfunktion innerhalb der Zellzykluskontrolle aus²⁰⁶. Zu den durch E2F-Proteine regulierten Genen gehören sowohl Zellzyklusregulatoren (z.B. Zyklin E und Cdc2) als auch Enzyme der Nukleotidbiosynthese (z.B. Dihydrofolatreduktase)²⁰⁶. Die Effekte der E2F-Proteine (mit Ausnahme von E2F-6) werden durch Interaktion mit sog. *pocket proteins*, welche das Retinoblastoma-Protein, p107 und p130 umfassen, reguliert²⁰⁶. E2F-1 war das erste Gen, welches gleichzeitig die Kriterien eines Onkogens als auch eines Tumorsuppressorgens erfüllte²⁰⁷.

Durch unsere Ergebnisse wurde erstmalig eine Verbindung zwischen der zellzyklusassoziierten E2F-Familie und essentieller Hypertonie aufgezeigt.

Unsere genetischen und klinischen Daten bezüglich der hypertonieassoziierten ECE-1b-Promotorpolymorphismen sowie unsere molekularbiologischen Resultate bezüglich haplotypabhängiger Promotoraktivität konnten kürzlich durch eine unabhängige Arbeitsgruppe reproduziert werden^{208, 209}. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass der von uns initial identifizierte und funktionell charakterisierte C-338A-Promotorpolymorphismus signifikant mit Morbus Alzheimer beim Menschen assoziiert ist, und zwar in einer vergleichbaren Größenordnung wie das ApoE2-Allel.

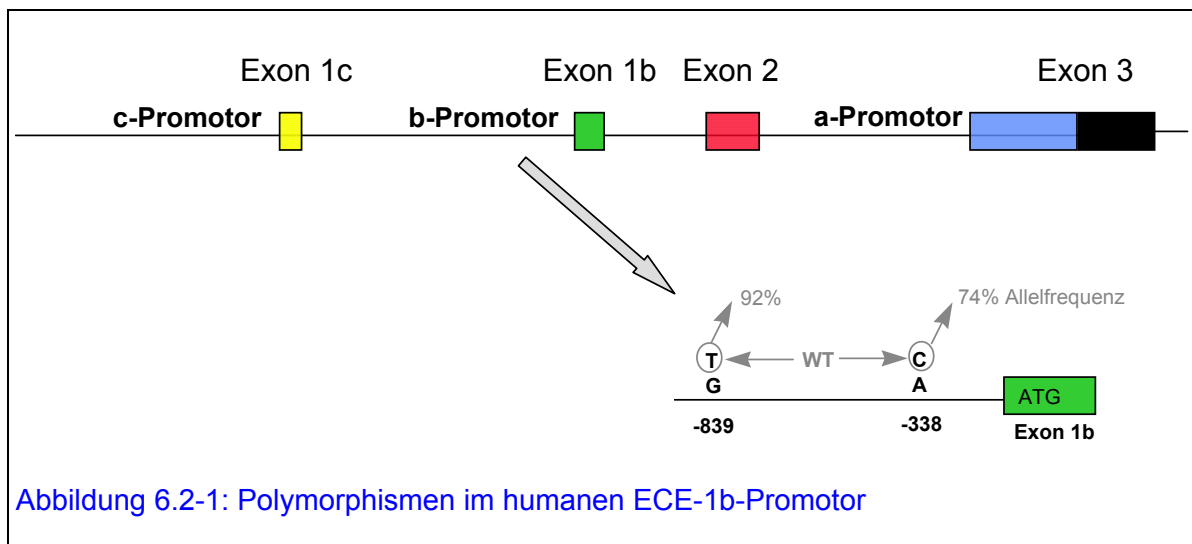


Abbildung 6.2-1: Polymorphismen im humanen ECE-1b-Promotor

6.3 Eigene Arbeiten - Polymorphismen im ECE-1c-Genpromotor

Im Gegensatz zum ECE-1b-Promotor, in welchem SNPs Untersuchungsgegenstand waren, wurden im Promotor der humanen ECE-1c-Isoform Mikrosatelliten-*repeats* von uns analysiert (Originalarbeit 14.3). Bei diesen Mikrosatelliten handelt es sich um einen $(CA)_n$ -Dinukleotidrepeat sowie einen $(CG)_n$ -($CA)_n$ -Dinukleotidrepeat (Abbildung 6.3-1).

Wir konnten anhand unterschiedlicher humaner DNA-Proben und mittels verschiedener Methoden (radioaktive genomische PCR, direkte Sequenzierung von PCR-Produkten und Sequenzierung post Subklonierung) zeigen, dass all diese Mikrosatelliten bezüglich ihrer Repeatanzahl hochpolymorph sind (Originalarbeit 14.3). Diese Mikrosatellitenpolymorphismen haben eine starke funktionelle Auswirkung auf die basale Promotoraktivität. Der im Vergleich zu vielen anderen Promotoren starke ECE-1c Promotor wird in neuronalen und auch endothelialen Zellen durch die entsprechenden Allele zum Teil um einen Faktor > 2 in seiner Aktivität beeinflusst (Originalarbeit 14.3).

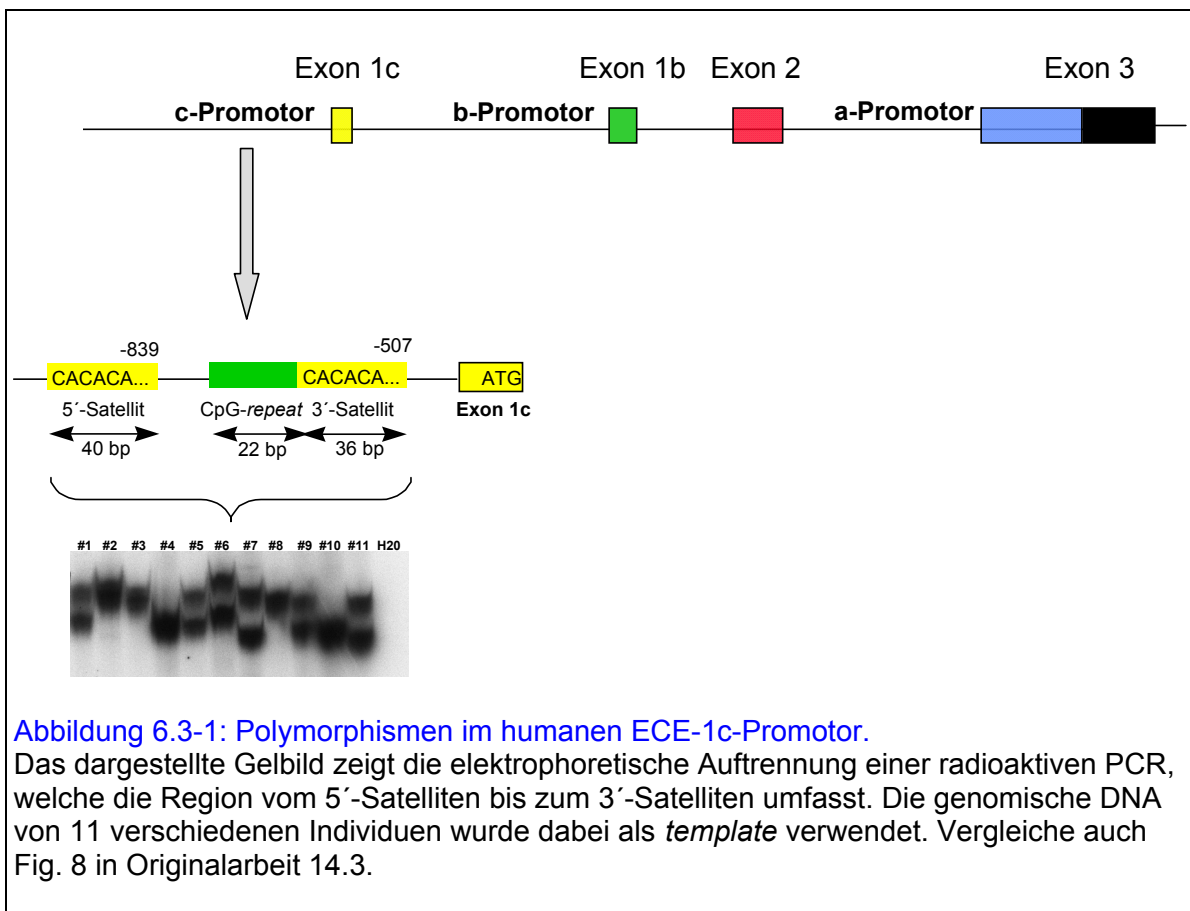


Abbildung 6.3-1: Polymorphismen im humanen ECE-1c-Promotor.

Das dargestellte Gelbild zeigt die elektrophoretische Auftrennung einer radioaktiven PCR, welche die Region vom 5'-Satelliten bis zum 3'-Satelliten umfasst. Die genomische DNA von 11 verschiedenen Individuen wurde dabei als *template* verwendet. Vergleiche auch Fig. 8 in Originalarbeit 14.3.

7. Epigenetik

7.1 Bedeutung der Epigenetik

Methylierung von CpG-Dinukleotiden ist ein weiterer Mechanismus der eukaryontischen Genregulation, wobei dieser unter anderem bei der X-Chromosom-Inaktivierung²¹⁰, dem Imprinting²¹¹, der Unterdrückung von parasitären Sequenzelementen im Genom²¹², der Tumorgenese^{213, 214}, und im Rahmen der *memory formation*^{215, 216} von Bedeutung ist. Methylierung von CpG-Dinukleotiden in Promotoren ist mit Suppression der Promotoraktivität verbunden; dieser Effekt wird unter anderem durch Histondeazetylierung und durch sogenannte *methyl-CpG-binding proteins* (u.a. MeCP2 und MBD1) vermittelt^{217, 218, 219, 220}. Darüber hinaus besitzt Promotormethylierung auch eine pharmakogenomische Bedeutung. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Promotormethylierung des DNA-Reparaturenzyms MGMT bei humanen Gliomen mit dem Ansprechen auf Chemotherapie und mit der Überlebensrate korreliert²²¹. Von weiterem klinischen Interesse ist, dass eine gezielte Induktion von Promotormethylierung erfolgreich in einem Tumormodell *in vivo* angewendet werden konnte²²² und dass Inhibitoren der DNA-Methylierung schon in klinischen Studien - insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen - eingesetzt werden^{214, 223}. Ebenso kommt der Epigenetik eine zunehmende Bedeutung in der kardiovaskulären Medizin zu^{224, 225}.

Die sog. CpG-Inseln, die sich in der Regel über einen Bereich von mehr als 500 bp erstrecken, sind nicht nur durch einen hohen GC-Gehalt gekennzeichnet, sondern auch durch eine hohe Frequenz von CpG-Dinukleotiden. CpG-Inseln sind in der Regel unmethyliert^{226, 227}, und ca. 60% der durch die RNA Polymerase II transkribierten Gene besitzen CpG-Inseln in ihren Promotoren²²⁸.

Von Bedeutung bezüglich Abschnitt 7.2 ist, dass CpG-Inseln (also eine Häufung von CpG-Dinukleotiden) und (CpG)_n-Mikrosatelliten nicht identisch sind. Die Häufigkeit der direkten, also ununterbrochenen Wiederholung des Dinukleotids, d.h. das "n", beträgt bei Mikrosatelliten gewöhnlich 15-30²²⁹. Solche GC-Mikrosatelliten-*repeats* sind relativ selten und machen nur 0.1% aller Dinukleotid-*repeats* aus²²⁶.

7.2 *Eigene Arbeiten* - Epigenetische Aspekte der Regulation des ECE-1c-Promotors

Der von uns klonierte humane ECE-1c-Promotor besitzt, wie in Abschnitt 6.3 beschrieben, einen polymorphen (CpG)_n-Mikrosatellitenrepeat. Daher bestand das Ziel darin, nicht nur den Einfluß des *repeat*-Polymorphismus auf die Promotoraktivität zu analysieren (s. Abschnitt 6.3), sondern auch die putative Regulation dieses Promotorabschnitts durch Methylierung.

Unter Anwendung einer modifizierten Natriumbisulfit-Methode zur Methylierungsdetektion, welche mit Subklonierungs- und Sequenzierungsschritten verbunden war, konnten wir nachweisen, dass der CpG-Mikrosatellit des humanen ECE-1c-Promotors unter basalen Bedingungen in epithelialen und endothelialen Zellen nicht methyliert ist ([Originalarbeit 14.3](#)).

Auf der anderen Seite zeigten transiente Transfektionen von Deletionsmutanten des ECE-1c-Promotors - wobei diese im *in vitro*-methylierten bzw. unmethylierten, nativen Zustand verwendet wurden -, dass der ECE-1c-Promotor insgesamt durch Methylierung stark supprimiert werden kann ([Originalarbeit 14.3](#)). Dieser Befund wurde weiterhin durch sog. *patch*-Methylierungsversuche, bei welchen nur bestimmte Bereiche des Promotor-Luziferase-Konstruktes methyliert werden, validiert ([Originalarbeit 14.3](#)).

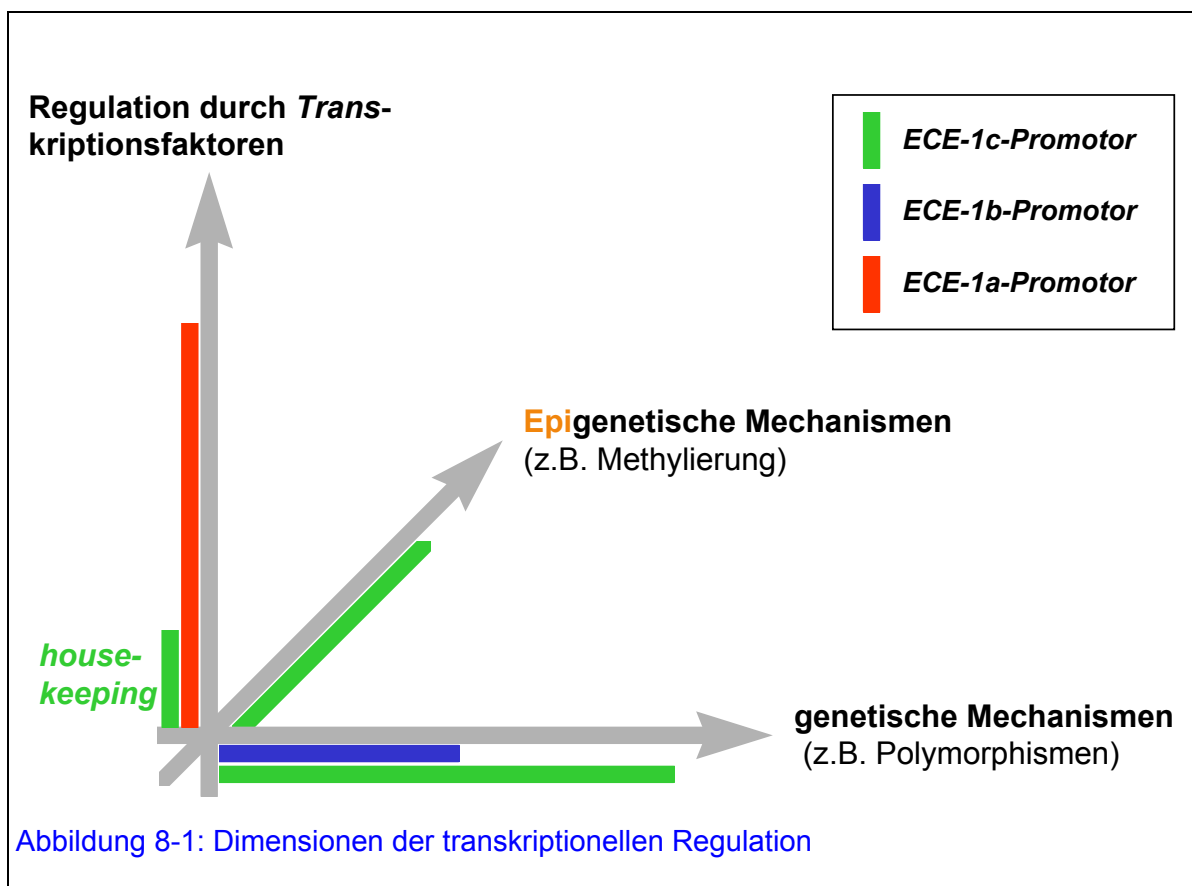
Um die Bedeutung des CpG-*repeat* selbst im Rahmen dieser Suppression zu analysieren, wurden weitere Deletionsmutanten kloniert und im methylierten bzw. unmethylierten Zustand transfiziert. Es konnte demonstriert werden, dass der CpG-*repeat* (zusammen mit dem sich direkt anschließenden CA-*repeat*) ein positives regulatorisches Element darstellt, wobei dieser aktivierende Effekt im unmethylierten und ungewöhnlicherweise ebenso im methylierten Zustand des CpG-*repeat* beobachtet wurde ([Originalarbeit 14.3](#)).

8. Dimensionen der transkriptionellen Regulation

Die in den vorangehenden Abschnitten diskutierten Ergebnisse haben uns dazu geführt, dass wir die Promotorebene selbst als dreidimensionales System betrachten. Dabei stellen (1) Regulation durch klassische Transkriptionsfaktoren [Abschnitte 3, 4 u. 5], (2) genetische Effekte (insbesondere der Effekt von Polymorphismen, z.B. SNPs) [Abschnitt 6] und (3) epigenetische Mechanismen (z.B. Methylierungsmuster von Promotoren) [Abschnitt 7] die entsprechenden Achsen dar. Auf diesen Achsen wurden und werden Promotoren von uns funktionell untersucht und klassifiziert, was in [Abbildung 8-1](#) beispielhaft für die alternativen Promotoren des humanen Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 dargestellt ist. Der Promotor der c-spezifischen Isoform des humanen Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 (ECE-1) weist *housekeeping*-Eigenschaften auf - was geringere Regulation durch TFs impliziert -, kann durch Methylierung reguliert werden und wird in seiner Aktivität in größerem Maße durch Polymorphismen beeinflusst (Abschnitte 3.2, 7.2 und 6.3).

Im Gegensatz zur ECE-1c-Isoform kann der ECE-1a-Promotor durch Induktion des Proteinkinase C-Signaltransduktionsweges aktiviert werden (Abschnitt 3.2) und ist damit in höherem Maße regulierbar als diese.

Die Beeinflussung des ECE-1b-Promotors durch SNPs ist von klinischer Relevanz, jedoch quantitativ von geringerer Ausprägung als der Effekt des Mikrosatelliten-polymorphismus im ECE-1c-Promotor (Abschnitte 6.2 und 6.3).



Die drei oben dargestellten Achsen sind jedoch nicht unabhängig voneinander. So konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen Polymorphismen und Epigenetik in dem Sinne besteht, dass durch einen SNP ein methylierbares CpG-Dinukleotid entstehen kann^{230, 231}. Die Komplexität zellulärer Regulation wird darüber hinaus durch eine Vielzahl weiterer Mechanismen gesteigert. Polymorphismen können entscheidend zur Modulation einer Gen-Umwelt-Interaktion beitragen, in dem Sinne, dass die Reagibilität auf einen bestimmten Umweltreiz vom Haplotyp abhängig ist^{232, 233}. Weiterhin können

psychosoziale^{234, 235} und nutritive²³⁶ Umweltfaktoren den Methylierungsstatus von Promotoren und damit die Genfunktion verändern.

Nicht nur die zuvor diskutierten SNPs und Mikrosatelliten-Polymorphismen erhöhen die interindividuelle Variabilität, sondern auch die sog. CNVs (*copy number variations*). CNVs, von denen etwa 1500 im menschlichen Genom existieren und welche ungefähr 12% des humanen Genoms abdecken, scheinen mehr zur genetischen Diversität beizutragen als SNPs^{237, 238}.

In einer kürzlich erschienenen, wegweisenden Publikation konnte nachgewiesen werden, dass der transkriptionellen Aktivierung auf Promotorebene oszillierende Prozesse zugrunde liegen können²³⁹. In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass nicht nur nukleäre Rezeptoren, sondern auch die sog. *general transcription factors* (GTFs) [wie z.B. TBP (*TATA box*-bindendes Protein), TFIIA, TFIIB und TAFs (TBP-assoziierte Faktoren) des basalen Transkriptionsapparates], Chromatin-*remodeling*-Faktoren [wie z.B. SWI/ SNF] und Kofaktoren [wie z.B. HDACs (Histon-Deacetylasen)] mit einer oszillierenden Kinetik auf die entsprechenden Promotorregionen rekrutiert werden.

Darüber hinaus stellt die Lage eines Gens innerhalb des dreidimensionalen Zellkerns einen regulierten Prozess dar, wobei bestimmte *cis*-Elemente die nukleäre Position determinieren können^{240, 241, 242}. In diesem Zusammenhang der Chromatinregulation ist von Bedeutung, dass Genaktivität weiterhin durch multiple, kovalente Histonmodifikationen, den sog. *histone code*, reguliert wird^{243, 244}.

Weiterhin ist die Translokation von Transkriptionsfaktoren durch die Kernporen in den Zellkern bzw. aus diesem heraus ein regulierter und komplexer Prozess, wobei mehr als eine Million Makromoleküle pro Minute und pro Zelle aktiv transportiert werden können^{245, 246}. Hierbei ist auch von Bedeutung, dass Genprodukte, also auch transkriptionelle Regulatoren, nicht nur isoliert agieren, sondern auch unter Ausbildung von sog. Modulen - quasi makromolekularen Maschinen -^{247, 248, 249} und intrazellulären, biologischen Netzwerken²⁵⁰.

Schließlich unterliegt eukaryontische Transkription auch stochastischen Aspekten, wobei transkriptionelle Aktivatoren die Wahrscheinlichkeit regulieren, ob ein Promotor bzw. *enhancer* aktiv oder inaktiv ist (sog. *binary switch*)^{251, 252}.

9. Therapeutische Aspekte

9.1 Endothelinsystem

Die Therapie mit dem dualen ET_A-ET_B-Rezeptorantagonisten Bosentan zählt derzeit zur Standardtherapie der primären [idiopathischen (sporadischen) und familiären pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH)] und sekundären pulmonalen Hypertonie^{253, 254}. Auch dem von uns charakterisierten ECE-1 kommt eine pathophysiologische Bedeutung bei dieser Erkrankung zu²⁵⁵.

In den letzten Jahren konnten nicht-selektive ECE-1-Inhibitoren, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass auch das ANP-abbauende Enzym Neutrale Endopeptidase (NEP) gehemmt wird, sowie selektive ECE-1-Inhibitoren entwickelt werden²⁵⁶.

Nicht-selektive ECE-1-Hemmer wie z.B. Phosphoramidon, SLV-306 oder CGS-26393 konnten im Tierexperiment ihre Wirksamkeit bezüglich der Reduktion von pulmonalarteriellem Druck, Hypertonie, Neointimabildung und Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung (SAB) sowie bei Herzinsuffizienz zeigen^{257, 258, 259, 256}. SLV-306 war der erste ECE-1-Inhibitor, der die klinische Prüfung erreicht hat, und befindet sich derzeit in der Phase II für die Indikationen Herzinsuffizienz und Hypertonie^{256, 260}.

Selektive ECE-1-Inhibitoren wie FR-901533, CGS-35066 oder Ro-68-7629 sind ebenfalls im Tierexperiment wirksam bei Vasospasmus post SAB, Herzinsuffizienz und Neointimabildung^{261, 256}.

Den von uns charakterisierten Polymorphismen im ECE-1-Gen könnte aufgrund der erwähnten ECE-1-Inhibitoren eine putative pharmakogenetische Relevanz zukommen, da diese möglicherweise Pharmakokinetik (z.B. im Sinne einer Veränderung der Kompartiment-Verteilung) und/ oder Pharmakodynamik interindividuell beeinflussen.

Die Bedeutung der in dieser Arbeit analysierten ECE-Isoformen im Rahmen der teilweise schon etablierten, therapeutischen ECE-1-Inhibition ist derzeit noch nicht untersucht worden²⁵⁶. Die Generierung und Analyse von isoformspezifischen ECE-1-*knockout*-Mäusen könnte hier neue Einblicke eröffnen. Bisherige Befunde zeigen jedoch schon, dass Phosphoramidon die Halbwertszeit der ECE-1a-, nicht jedoch der ECE-1b-Isoform, verlängert²⁶², was - aufgrund der unterschiedlichen subzellulären Lokalisation der ECE-1-Isoformen - mit einer Umverteilung von ECE-1 in intrazelluläre Kompartimente einhergeht^{263, 264}. Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen ECE-1-Isoformen im Rahmen einer Pharmakotherapie unterschiedlich beeinflusst werden.

In diesem Kontext könnte eine zukünftige isoformspezifische ECE-1-Inhibition oder Modulation zum Beispiel durch *decoy*-Oligonukleotide (s. Abschnitt 9.5) sinnvoll sein, da insbesondere die a- und b-Isoformen im pathophysiologischen Kontext, beispielsweise Leberzirrhose²⁶⁵, Herzinsuffizienz²⁶⁶, Hypertonie²⁶⁷, und wahrscheinlich Neointimaformation²⁶⁸, reguliert zu sein scheinen, während die c-Isoform *housekeeping*-Eigenschaften aufweist^{269, 266, 270, 267} und möglicherweise zur Aufrechterhaltung des basalen Vasotonus, zu dem ECE-1 beiträgt²⁷¹, notwendig ist.

Isoformspezifische Therapie im Allgemeinen könnte auch im neuropsychiatrischen Bereich eine Rolle spielen. Phosphodiesterase-Inhibitoren besitzen einen antidepressiven Effekt²⁷². Da ein stimulierter cAMP-*pathway* jedoch unterschiedliche Wirkungen in verschiedenen Hirnregionen aufzuweisen scheint (u.a. antidepressiv im Hippocampus, prodepressiv im Nucleus accumbens und proemetisch im Hirnstamm), werden derzeit isoformspezifische PDE4-Hemmer als neue effektive und nebenwirkungsärmere Antidepressiva diskutiert²⁷².

9.2 AT2-Rezeptor

Wie in Abschnitt 4.1 diskutiert, kommt der Aktivierung des AT2R im Rahmen einer Therapie mit Angiotensin-AT1-Rezeptorblockern (ARBs) eine klinisch-pharmakologische Bedeutung zu. Weiterhin konnte kürzlich der erste, oral verfügbare AT2R-Agonist (*compound 21*) entwickelt werden²⁷³, welcher sich derzeit in der präklinischen Phase der

Medikamentenentwicklung befindet und im Tiermodell die Myokardfunktion nach Herzinfarkt positiv zu beeinflusst²⁷⁴.

Das von uns klonierte AT2R-Adaptorprotein ATBP wurde von einer anderen Arbeitsgruppe als ein Tumorsuppressorgen identifiziert²⁷⁵ und stellt somit ein putatives, zukünftiges therapeutisches *target* dar.

9.3 Renin-/ Prorenin-Rezeptor

Die Bedeutung des RER im Rahmen einer Therapie mit der neuen Medikamentenklasse der Renin-Inhibitoren, welche die katalytische Aktivität des Renins hemmen, wurde in Abschnitt 4.3 beschrieben.

Wir planen, die von uns entschlüsselte Renin-RER-PLZF-PI3K/RER-Signaltransduktionskaskade (Abbildung 4.4-1) dazu zu verwenden, direkte Antagonisten am RER zu identifizieren, welche von uns als RERBs (*renin/ prorenin receptor blocker*) bezeichnet werden. RERBs sollen im Gegensatz zu Renin-Inhibitoren die Ligandenaktivität von Prorenin und Renin am RER blockieren.

Derzeit wird von uns - in Analogie zu den Luziferasereporterassays in Originalarbeit 14.1 - ein *high-throughput screening assay* (HTS) entwickelt, mit welchem dann nachfolgend Substanzen einer Substanzbibliothek identifiziert werden können, die den RER hemmen. Ein entsprechendes Patent wurde im August 2006 von unserer Gruppe beim Europäischen Patentamt eingereicht (06016940.6/ Ep06016940, "Determination of renin/ prorenin receptor activity").

Aufgrund der unter 4.3 beschriebenen Bedeutung des RER in der Pathophysiologie des renalen und kardialen Endorganschadens sollen RERBs präklinisch und klinisch dazu entwickelt werden, diesen bei Hochrisikogruppen (Vorliegen eines metabolischen Syndroms, Proteinurie oder Zustand post Myokardinfarkt etc.) im Sinne eines Endorganprotektivums zu verhindern bzw. zu reduzieren.

9.4 Prionen-Protein

Da die Expression von PrP^C eine Voraussetzung für die Pathogenese von Prionen-erkrankungen ist (Abschnitt 5.1), ist es naheliegend, dass eine Reduktion des endogenen Spiegels von PrP^C prophylaktisch und/ oder therapeutisch sinnvoll sein kann. Daher stellt der von uns klonierte Promotor des Prionen-Protein-Gens unserer Meinung nach eine pharmakologische Zielstruktur dar, die beispielsweise mittels *decoy*-Oligonukleotiden reprimiert werden könnte. Dies ist auch insofern von Bedeutung, da Therapien, die sich gegen das PrP^{Sc} richten, nicht effizient zu sein scheinen^{180, 276}.

Da die PrP^C-*knockout*-Mäuse nur einen minimalen Phänotypen zeigen^{277, 278}, der weiterhin durch die Hochregulation des Doppel-Proteins bedingt ist^{175, 279}, wäre eine pharmakologische oder genterapeutische Reprimierung von PrP^C denkbar, ohne dass man aufgrund des bisherigen Kenntnisstandes größere Nebenwirkungen hierdurch zu erwarten hätte. Weiterhin deuten unsere Daten (Abschnitt 5.2) darauf hin, dass je nach Zelltyp unterschiedliche Transkriptionsfaktoren an der Regulation des PrP^C-Promotors beteiligt sind, so dass mittels Intervention auf Promotorebene - i. Ggs. zu einer solchen auf mRNA-Ebene - theoretisch eine gewebespezifische Therapie möglich ist.

9.5 Zukünftige Therapieansätze

Nicht nur die zuvor genannten Proteinstrukturen können ein pharmakologisches *target* darstellen, sondern auch die Promotorebene selbst kann als eine therapeutische Zielstruktur aufgefasst werden. So können nicht nur Steroidhormone und Schilddrüsenhormone, sondern auch "klassische Pharmaka" wie Acetylsalicylsäure, Ciclosporin und FK506 (Tacrolimus) die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen²⁸⁰. Weiterhin sind die fettsenkenden Fibrate und die in der Therapie des

Diabetes mellitus eingesetzten Thiazolidindione (Glitazone) direkte Agonisten der ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren PPAR α bzw. PPAR γ ²⁸¹.

Auch "gentherapeutische" bzw. "molekulartherapeutische" Ansätze zur Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren bzw. Promotoraktivität sind beschrieben worden.

In der PREVENT-Studie konnte gezeigt werden, dass die *ex vivo*-Applikation von *decoy*-Oligonukleotiden gegen die Transkriptionsfaktorfamilie E2F beim Menschen die Okklusionsrate von venösen Bypässen signifikant reduziert²⁸². *Decoys* sind doppelsträngige Oligodesoxynukleotide mit der Konsensussequenz für bestimmte Transkriptionsfaktoren²⁸³, die in diesem Fall mit endogenen Promotoren um die Bindung von E2F-Transkriptionsfaktoren konkurrieren.

Weiterhin konnte demonstriert werden, dass künstliche Transkriptionsfaktoren (*designed transcription factors*) endogene Onkogene über Bindung an entsprechende Promotoren im chromosomalen Kontext herunterregulieren können, und diesem Ansatz daher ein therapeutisches Potential in der Onkologie zukommen könnte²⁸⁴.

Darüber hinaus wurde kürzlich eine neue, RNA-basierte Methode beschrieben, bei welcher Genexpression mittels sog. *antigene RNAs* (agRNAs), welche mit einzelsträngiger genomischer DNA im Bereich des transkriptionellen Startpunktes interagieren, supprimiert werden kann²⁸⁵.

Einen weiteren innovativen Ansatz stellt die gezielte Induktion von Promotormethylierung durch methylierte Oligonukleotide dar, welche eine Suppression der entsprechenden mRNA bedingt²²². Ebenso können siRNA, *antisense*-Oligonukleotide und Ribozyme dazu eingesetzt werden, Transkriptionsfaktoren zu inhibieren und damit Promotorfunktionen zu modulieren^{286, 287}. Schließlich kann ein sogenannter *antigene approach* unter Verwendung von triplexbildenden Oligonukleotiden dazu verwendet werden, einzelne Basen auf Genomebene auszutauschen, und damit prinzipiell Promotorsequenzen zu verändern^{288, 289}.

10. Zusammenfassung

Die Untersuchung von genregulatorischen Mechanismen im Endothelin- und Renin-Angiotensin-System stellt den Fokus dieser Habilitationsschrift dar, wobei (a) Protein-DNA-Interaktionen auf Promotorebene sowie Beeinflussung dieser durch Signaltransduktionswege, (b) Promotorpolymorphismen und (c) epigenetische Aspekte analysiert wurden.

Wir konnten den Promotor des humanen Prionenproteins sowie drei isoformspezifische Promotoren des humanen Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 (ECE-1) klonieren und funktionell - beispielsweise bezüglich transkriptioneller Startpunkte und *cis*-Elementen - charakterisieren. Dabei konnte unter anderem demonstriert werden, dass der im Rahmen der Herzentwicklung essentielle Transkriptionsfaktor Nkx2-5 die ECE-1a-, -1b- und -1c-Isoformen positiv reguliert, wobei Protein-DNA-Interaktionen, Promotoraktivitäten und die mRNA-Ebene analysiert wurden. Damit konnten wir erstmalig eine direkte molekulare Verbindung zwischen dem Endothelinsystem und Nkx2-5 aufzeigen, welcher eine wahrscheinliche Bedeutung in der Pathogenese angeborener Herzfehler zukommt.

Bezüglich des ECE-1b-Promotors konnten wir zwei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) identifizieren und beim Menschen die signifikante Assoziation dieser mit essentieller arterieller Hypertonie aufzeigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einer dieser Polymorphismen die Bindungsaffinität und die Transaktivierungsaktivität des Transkriptionsfaktors E2F-2 verändert, womit erstmalig eine Verbindung zwischen essentieller Hypertonie und Zellzyklusregulation demonstriert werden konnte.

Im humanen ECE-1c-Promotor wurde unter anderem der Methylierungsstatus sowie der funktionelle Effekt einer *in vitro*-Methylierung analysiert. Weiterhin konnte die ausgeprägte funktionelle Relevanz eines [CpG]_m-[CA]_n-Mikrosatellitenpolymorphismus nachgewiesen werden.

Bezüglich des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) konnte das zuvor unbekannte Protein ATBP (*AT2R binding protein*) durch uns kloniert werden, welches an den zytoplasmatischen Bereich des Angiotensin-AT2-Rezeptors (AT2R) bindet und antiproliferative Eigenschaften dieses Rezeptors vermittelt.

Kürzlich konnten wir als erste Arbeitsgruppe die Signaltransduktion des Renin-/ Prorenin-Rezeptors (RER) basierend auf Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen aufschlüsseln und nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor PLZF ein direktes Adapterprotein des RER darstellt, nach Rezeptoraktivierung in den Zellkern transloziert und dort zielgenabhängig als Aktivator aber auch Repressor fungieren kann.

Schließlich konnten wir eine neue Formel - die sog. GED (*Gene Expression's CT Difference*)-Formel - zur Auswertung von *real-time PCR*-Daten mathematisch herleiten und experimentell validieren.

11. Eidesstattliche Erklärung

Gemäß der Habilitationsordnung der Charité erkläre ich hiermit, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungen gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. wird,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/innen und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind, und
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Primär danken möchte ich vier Generationen meiner Familie - meiner Großmutter, meinen Eltern, meinem Bruder, Britta und meiner Tochter Helene - für all die vorbehaltlose emotionale und psychosoziale Unterstützung, die Geduld und die Freude, die ich durch Euch erfahre.

Mein besonderer und spezieller Dank gilt Frank Zollmann, Michael Richter und Jan Scheffé für die nicht zählbaren wissenschaftlichen und freundschaftlichen Diskussionen und Gespräche, die mich und mein "wissenschaftsphilosophisches" Weltbild nachhaltig geprägt haben.

Weiterhin danke ich Professor Martin Paul und Hans-Dieter Orzechowski, die mir in den ersten Jahren meiner wissenschaftlichen Arbeit ein Umfeld zur Verfügung gestellt haben, in welchem man sich frei entfalten und entwickeln konnte. In diesem Zusammenhang denke ich sehr gern an das "Labor 2" zurück, in welchem die Synthese aus wissenschaftlichem Arbeiten und inspirierend-freundschaftlich-kreativer Atmosphäre gelang. Insbesondere möchte ich dabei ehemalige Kollegen, Doktoranden bzw. Freunde wie Juliane Bremer, Madga Paterka, Marwan Mannaa, Christian von Langsdorff, Steffen Theis, Kathrin Scheuch, Alexander Thomas, Tina Behrouzi, Andreas Zimmermann, Simone Gschwend, Astrid Günther, Julia Lemmer und Juliane Bolbrinker dankbar erwähnen. Experimentelles Arbeiten in Labor 2 wäre weiterhin ohne die freundliche Hilfe von Birgitta Schwaneberg nicht möglich gewesen.

Die Projekte der letzten drei Jahre waren und sind nur durch die Mitarbeit und die Anstrengungen meiner Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie realisierbar. Dafür möchte ich Sylvia Scheele, Jana Reinemund, Kerstin Seidel, Yaosi Li, Marlen Katerbaum, Jens Schacherl, Peter Marschall sowie Mario Menk sehr danken.

Weiterhin gilt mein großer Dank allen anderen, namentlich bisher nicht genannten Koautoren der hier dargestellten Publikationen, ohne die diese Habilitationsschrift nicht möglich gewesen wäre. Dabei möchte ich die Kooperationen mit Stefan-Martin Brand-Herrmann besonders erwähnen. Weiterhin bin ich Mark Ptashne und Vidya Prabhu besonders dankbar, da sie mir die Möglichkeit gaben, die Methode ChIP zu erlernen.

Und schließlich gilt mein tiefer Dank Professor Thomas Unger, der mich in allen wissenschaftlichen, wissenschaftsbürokratischen und wissenschaftspolitischen Belangen kontinuierlich und ohne zeitliche Latenz unterstützt hat und mit dem Center for Cardiovascular Research (CCR) ein perfektes Arbeitsumfeld geschaffen hat. Auch möchte ich mich bei Miranda Schröder für ihre Hilfe in den letzten Jahren bedanken.

13. Literaturverzeichnis

- ¹ Butler, J.E.F., Kadonaga, J.T. (2002):
The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression.
Genes Dev 16: 2583-2592
- ² Werner, T. (1999):
Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters.
Mamm Genome 10: 168-175
- ³ Novina, C.D., Roy, A.L. (1996):
Core promoters and transcriptional control.
Trends Genet 12: 351-355
- ⁴ Smale, S.T. (2001):
Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation.
Genes Dev 15: 2503-2508
- ⁵ Michael E. Dahmus (1996):
Reversible Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II.
J Biol Chem 271: 19009-19012
- ⁶ Roeder, R.G. (1996):
The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II.
Trends Biochem Sci 21: 327-335
- ⁷ Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., Smale, S.T. (1994):
DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells.
Mol Cell Biol 14: 116-127
- ⁸ Smale, S.T. (1997):
Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes.
Biochem Biophys Acta 1351: 73-88
- ⁹ Goodrich, J.A., Cutler, G., Tjian, R. (1996):
Contacts in Context: Promoter Specificity and Macromolecular Interactions in Transcription.
Cell 84: 825-830
- ¹⁰ Burke, T.W., Kadonaga, J.T. (1997):
The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*.
Genes Dev 11: 3020-3031
- ¹¹ Schibler, U. and Sierra, F. (1987):
Alternative promoters in developmental gene expression.
Annu Rev Genet 21: 237-257
- ¹² Ayoubi, T. A. and Van De Ven, W. J. (1996):
Regulation of gene expression by alternative promoters.
FASEB J 10: 453-460
- ¹³ International Human Genome Sequencing Consortium (2001):
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 409: 860-921
- ¹⁴ The ENCODE Project Consortium (2004):
The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) project.
Science 306: 636-639
- ¹⁵ Levine, M., Tjian, R. (2003):

Transcription regulation and animal diversity.
Nature 424: 147-151

¹⁶ Ayoubi, T.A.Y., van de Ven, W.J.M. (1996):
Regulation of gene expression by alternative promoters.
FASEB J 10: 453-460

¹⁷ Schibler, U., Sierra, F. (1987):
Alternative promoters in developmental gene expression.
Ann Rev Genet 21: 237-257

¹⁸ Orzechowski, H.-D., Günther, A., Menzel, S., Zimmermann, A., Funke-Kaiser, H. et al. (2001):
Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells.
Mol Pharmacol 60: 1332-1342

¹⁹ S.F. Gilbert: Developmental Biology. Fifth Edition, 1997, Sunderland, USA

²⁰ Roeder, R.G. (2003):
The eukaryotic transcriptional machinery: complexities and mechanisms unforeseen.
Nature Med 9: 1239-1244

²¹ Enard, W., Przeworski, M., Fisher, S.E. et al. (2002):
Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language.
Nature 418: 869-872

²² Olson, M.V. and Varki, A. (2003):
Sequencing the chimpanzee genome: insights into human evolution and disease.
Nat Rev Genet 4: 20-28

²³ Li, W.-H., Saunders, M. A. (2005):
The chimpanzee and us.
Nature 437: 50-51

²⁴ Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A. et al. (1996):
Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.
Science 274: 1527-1531

²⁵ Bosma, P.J., Chowdhury, J.R., Bakker, C. et al. (1995):
The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome.
N Engl J Med 333: 1171-1175

²⁶ Villard, E., Tiret, L., Visvikis, S. et al. (1996):
Identification of new polymorphisms of angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation analysis.
Am J Hum Genet 58: 1268-1278

²⁷ Knight, J.C., Udalova, I., Hill, A.V.S. et al. (1999):
A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria.
Nature Genetics 22: 145-150

²⁸ El-Omar, E.M., Carrington, M., Chow, W.-H. et al. (2000):
Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer.
Nature 404: 398-402

²⁹ Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E. et al. (2003):
Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene.
Science 301: 386-389

-
- ³⁰ Tiago, A.D., Samani, N.J., Candy, G.P. et al. (2002):
Angiotensinogen gene promoter region variant modifies body size–ambulatory blood pressure relations in hypertension.
Circulation 106: 1483-1487
- ³¹ Drazen, J.M., Yandava, C.N., Dube, L. et al. (1999):
Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment.
Nature Genetics 22: 168-170
- ³² Felix, C.A., Walker, A.H., Lange, B.J. et al. (1998):
Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia.
Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13176-13181
- ³³ Maston, G.A., Evans, S.K., Green, M.R. (2006):
Transcriptional regulatory elements in the human genome.
Annu Rev Genomics Hum Genet 7: 29–59
- ³⁴ Weinmann, A.S. (2004):
Novel ChIP-based strategies to uncover transcription factor target genes in the immune system.
Nat Rev Immunol 4: 381-386
- ³⁵ Alvarez, M., Rhodes, S.J., Bidwell, J.P. (2003):
Context-dependent transcription: all politics is local.
Gene 313: 43-57
- ³⁶ Perissi, V., Rosenfeld, M.G. (2005):
Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles.
Nat Rev Mol Cell Biol 6: 542-554
- ³⁷ Maniatis, T. and Reed, R. (2002):
An extensive network of coupling among gene expression machines.
Nature 416: 499-506
- ³⁸ Roeder, R.G. (2003):
The eukaryotic transcriptional machinery: complexities and mechanisms unforeseen.
Nature Med 9: 1239-1244
- ³⁹ Metivier, R., Penot, G., Hübner, M.R. et al. (2003):
Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter.
Cell 115: 751-763
- ⁴⁰ Bryant, G.O., Ptashne, M. (2003):
Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription.
Mol Cell 11: 1301-1309
- ⁴¹ Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S. et al. (1988):
A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.
Nature 332: 411-415
- ⁴² Levin, E.R. (1995):
Endothelins.
N Engl J Med 333: 356-363
- ⁴³ Yanagisawa, M. (1994):
The Endothelin System.
Circulation 89: 1320-1322
- ⁴⁴ Takahashi, M., Fukuda, K., Shimada, K. et al. (1995):

Localization of rat endothelin-converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells.

Biochem J 311: 657-665

⁴⁵ Nakagomi, S., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H. (2000):
Endothelin-converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species [...].
Neuroscience 101: 441-449

⁴⁶ Barnes, K., Walkden, B.J., Wilkinson, T.C. et al. (1997):
Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localization in rat hippocampus.
J Neurochem 68: 570-577

⁴⁷ Ehrenreich, H., Löffler, B.-M., Hasselblatt, M. et al. (1999): Endothelin converting enzyme activity in primary rat astrocytes is modulated by endothelin B receptors.
Bioch Biophys Res Com 261: 149-155

⁴⁸ Orzechowski, H.-D., Richter, C.-M., Funke-Kaiser, H. et al. (1997):
Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells.
J Mol Med 75: 512-521

⁴⁹ Emoto, N., Yanagisawa, M. (1995):
Endothelin-converting Enzyme-2 is a Membrane-bound, Phosphoramidon-sensitive Metalloprotease with Acidic pH Optimum.
J Biol Chem 270: 15262-15268

⁵⁰ Kedzierski, R.M., Yanagisawa, M. (2001):
Endothelin System: The Double-Edged Sword in Health and Disease.
Ann Rev Pharmacol Toxicol 41: 851-876

⁵¹ MacCumber, M.W., Ross, C.A., Snyder, S.H. (1990):
Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 87: 2359-2363

⁵² Sedo, Provero, P., Revoltella, R.P. et al. (1993):
BQ123 inhibits both endothelin 1 and endothelin 3 mediated C6 glioma cell proliferation suggesting an atypical endothelin receptor.
J Biol Regul Homeost Agents 7: 95-98

⁵³ Roux, S., Breu, V., Ertel, S.I., Clozel, M. (1999):
Endothelin antagonism with bosentan: a review of potential applications.
J Mol Med 77: 364-376

⁵⁴ Shimada, K., Matsushita, Y., Wakabayashi, K. et al. (1995):
Cloning and functional expression of human endothelin-converting enzyme cDNA.
Biochem Biophys Res Comm 207: 807-812

⁵⁵ Schmidt, M., Kröger, B., Jacob, E. et al. (1994):
Molecular characterization of human and bovine ECE-1.
FEBS Lett 356: 238-243

⁵⁶ Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelböck, P. et al. (1997):
Human ECE-1: Three isoforms with distinct subcellular localizations.
Biochem J 328: 871-877

⁵⁷ Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A. et al. (1999):
A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter.
Eur J Biochem 264: 341-349

-
- ⁵⁸ Valdenaire, O., Rohrbacher, E., Mattei, M.-G. (1995):
Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1).
J Biol Chem 270: 29794-29798
- ⁵⁹ Valdenaire, O., Barret, A., Schweizer, A. et al. (1999):
Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localizations of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms.
J Cell Science 112: 3115-3125
- ⁶⁰ Muller, L., Barret, A., Etienne, E. et al. (2003):
Heterodimerization of endothelin converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease.
J Biol Chem 278: 545-555
- ⁶¹ Funke-Kaiser, H., Bolbrinker, J., Theis, S. et al. (2000):
Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1).
FEBS Lett 466: 310-316
- ⁶² Valdenaire, O., Lepailleur-Enouf, D., Egidy, G., Thouard, A. et al. (1999):
A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter.
Eur J Biochem 264: 341-349
- ⁶³ Grubbs, A.L., Anstadt, M.P., Ergul, A. (2002):
Saphenous vein endothelin system expression and activity in african american patients.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 1122-1127
- ⁶⁴ Ihling, C., Szombathy, T., Bohrmann, B. et al. (2001):
Coexpression of endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 in different stages of human atherosclerosis.
Circulation 104: 864-869
- ⁶⁵ Sernerj, G.G.N., Cecioni, I., Vanni, S. et al. (2000):
Selective upregulation of cardiac endothelin system in patients with ischemic but not idiopathic dilated cardiomyopathy.
Circ Res 86: 377-385
- ⁶⁶ Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M. et al. (1996):
Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure.
Nature 384: 353-355
- ⁶⁷ Wang, X., Douglas, S.A., Loudon, C. et al. (1996):
Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat.
Circ Res 78: 322-328
- ⁶⁸ Shao, B., Yan, W., Rockey, D.C. (1999):
Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing.
J Biol Chem 274: 3228-3234
- ⁶⁹ Saleh, D., Furukawa, K., Tsao, M.-S. et al. (1997):
Elevated expression of ET-1 and ECE-1 in idiopathic pulmonary fibrosis.
Am J Respir Cell Mol Biol 16: 187-93
- ⁷⁰ Kwan, A.L., Lin, C.L., Chang, C.Z. et al. (2002):
Attenuation of SAH-induced cerebral vasospasm by a selective ECE inhibitor.
Neuroreport 13: 197-199
- ⁷¹ Jeng, A.Y. (2003):

Utility of endothelin-converting enzyme inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases.
Curr Opin Investig Drugs 4: 1076-1081

⁷² Egidy, G., Eberl, L.P., Valdenaire, O. et al. (2000):
The endothelin system in human glioblastoma.
Lab Invest 80: 1681-1689

⁷³ Johnson, G.D., Stevenson, T., Ahn, K. (1999):
Hydrolysis of peptide hormones by endothelin-converting enzyme-1. A comparison with neprilysin.
J Biol Chem 274: 4053-4058

⁷⁴ Eckman, E.A., Reed, D.K., Eckman, C.B. (2001):
Degradation of the Alzheimer's amyloid β peptide by endothelin converting enzyme.
J Biol Chem 276: 24540-24548

⁷⁵ Eckman, E. A., Watson, M., Marlow, L. et al. (2003):
Alzheimer's amyloid beta peptide ($A\beta$) is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme.
J Biol Chem 278: 2081-2084

⁷⁶ Yoshizawa, T., Iwamoto, H., Mizusawa, H. et al. (1992):
Cerebrospinal fluid endothelin-1 in Alzheimer's disease and senile dementia of Alzheimer type.
Neuropeptides 22: 85-88

⁷⁷ Funke-Kaiser, H., Reichenberger, F., Köpke, K., Herrmann, S.-M., Pfeifer, J., Orzechowski, H.-D., Zidek, W., Paul, M., Brand, E. (2003):
Differential binding of transcription factor E2F-2 to the endothelin-converting enzyme-1b promoter affects blood pressure regulation.
Hum Mol Genet 12: 423-433

⁷⁸ Funalot, B., Ouimet, T., Claperon, A. et al. (2004):
Endothelin-converting enzyme-1 is expressed in human cerebral cortex and protects against Alzheimer's disease.
Mol Psychiatry 9: 1122-1128

⁷⁹ Funke-Kaiser, H., Bolbrinker, J., Theis, S., Lemmer, J., Richter, C.-M., Paul, M., Orzechowski, H.-D. (2000):
Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1).
FEBS Lett. 466: 310-316

⁸⁰ Orzechowski, H.-D., Richter, C.-M., Funke-Kaiser, H., Kröger, B., Schmidt, M., Menzel, S., Bohnemeier, H., Paul, M. (1997):
Evidence of alternative promoters directing isoform-specific expression of human endothelin-converting enzyme-1 mRNA in cultured endothelial cells.
J Mol Med 75: 512-521

⁸¹ Funke-Kaiser, H., Orzechowski, H.-D., Richter, M., Paul, M. (1998):
Human endothelin-converting enzyme-1 β (ECE-1 β) mRNA expression is regulated by an alternative promoter.
J Cardiovasc Pharmacol 31 (suppl. 1): S7-S9

⁸² Orzechowski, H.-D., Richter, C.-M., Funke-Kaiser, H., Lemmer, J., Theis, S., Paul, M. (1999):
Cloning and functional characterization of the bovine endothelin-converting enzyme-1a promoter.
Biochim Biophys Acta 1446: 352-358

⁸³ Orzechowski, H.-D., Günther, A., Menzel, S., Zimmermann, A., Funke-Kaiser, H., Real, R., Subkowski, T., Zollmann, F.S., Paul, M. (2001):
Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells.
Mol Pharmacol 60: 1332-1342

-
- ⁸⁴ Yanagisawa, H., Yanagisawa, M., Kapur, R.P. et al. (1998):
Dual genetic pathways of endothelin-mediated intracellular signaling revealed by targeted disruption of endothelin converting enzyme-1 gene.
Development 125: 825-836
- ⁸⁵ Kurihara, Y., Kurihara, H., Suzuki, H. et al. (1994):
Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1.
Nature 368: 703-710
- ⁸⁶ Clouthier, D.E., Hosoda, K., Richardson, J.A. et al. (1998):
Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice.
Development 125: 813-824
- ⁸⁷ Greenstein Baynash, A., Hosoda, K., Giaid, A. et al. (1994):
Interaction of endothelin-3 with endothelin-b receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons.
Cell 79: 1277-1285
- ⁸⁸ Hosoda, K., Hammer, R.E., Richardson, J.A. et al. (1994):
Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice.
Cell 79: 1267-1276
- ⁸⁹ Takebayashi-Suzuki, K., Yanagisawa, M., Gourdie, R.G. et al. (2000):
In vivo induction of cardiac Purkinje fiber differentiation by coexpression of preproendothelin-1 and endothelin converting enzyme-1.
Development 127: 3523-3532
- ⁹⁰ Hofstra, R.M.W., Valdenaire, O., Arch, E. et al. (1999):
A loss-of-function mutation in the endothelin-converting enzyme 1 (ECE-1) associated with hirschsprung disease, cardiac defects, and autonomic dysfunction.
Am J Hum Genet 64: 304-308
- ⁹¹ Kirby, M.L., Waldo, K.L. (1990):
Role of neural crest in congenital heart disease.
Circulation 82: 332-340
- ⁹² Shin, M.K., Levorse, J.M., Ingram, R.S., Tilghman, S.M. (1999):
The temporal requirement for endothelin-B signalling during neural crest development.
Nature 402: 496-501
- ⁹³ Schwartz, R.J., Olson, E.N. (1999):
Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription.
Development 126: 4187-4192
- ⁹⁴ Ehrman, L.A., Yutzey, K.E. (1999):
Lack of regulation in the heart forming region of avian embryos.
Dev Biol 207: 163-175
- ⁹⁵ Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L. et al. (1995):
Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene Nkx2-5.
Genes Dev 9: 1654-1666
- ⁹⁶ Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S. et al. (1999):
The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development.
Development 126: 1269-1280
- ⁹⁷ Schott, J.J., Benson, D.W., Basson, C.T. et al. (1998):

Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5.
Science 281: 108–111

⁹⁸ Benson, D.W., Silberbach, G.M., Kavanaugh-McHugh, A. et al. (1999):
Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental
pathways. *J Clin Invest* 104: 1567–1573

⁹⁹ Goldmuntz, E., Geiger, E., Benson, D. W. (2001):
Nkx2.5 mutations in patients with tetralogy of Fallot.
Circulation 104: 2565–2568

¹⁰⁰ Olsen, E.N., Srivastava, D. (1996):
Molecular pathways controlling heart development.
Science 272: 671-676

¹⁰¹ Hagmann, M. (1999):
A gene that scrambles your heart.
Science 283: 1091-1093

¹⁰² Srivastava, D., Olson, E.N. (2000):
A genetic blueprint for cardiac development.
Nature 407: 221-226

¹⁰³ Thompson, J. T., Rackley, M. S., and O'Brien, T. X. (1998):
Upregulation of the cardiac homeobox gene Nkx2-5 (CSX) in feline right ventricular pressure
overload.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 274: H1569–H1573

¹⁰⁴ Kasahara, H., Wakimoto, H., Liu, M. et al. (2001):
Progressive atrioventricular conduction defects and heart failure in mice expressing a mutant
Csx/Nkx2.5 homeoprotein.
J Clin Invest 108: 189–201

¹⁰⁵ de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T. (2000):
International Union of Pharmacology. XXII. The angiotensin II receptors.
Pharmacol Rev 52: 415-472

¹⁰⁶ Lavoie, J.L., Sigmund, C.D. (2003):
Minireview: overview of the renin-angiotensin system — an endocrine and paracrine system.
Endocrinology 144: 2179-2183

¹⁰⁷ Volpe, M., Musumeci, B., De Paolis, P., Savoia, C., Morganti, A. (2003):
Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease?
J Hypertens 21: 1429-1443

¹⁰⁸ Stoll, M., Steckelings, U.M., Paul, M., Bottari, S.P., Metzger, R., Unger, T. (1995):
The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells.
J Clin Invest 95: 651-657

¹⁰⁹ Rockman, H.A., Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. (2002):
Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function.
Nature 415: 206-211

¹¹⁰ Widdop, R.E., Jones, E.S., Hannan, R.E., Gaspari, T.A. (2003):
Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype?
Br J Pharmacol 140: 809-824

¹¹¹ Mifune, M., Sasamura, H., Shimizu-Hirota, R. et al. (2000):
Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle
cells.
Hypertension 36: 845-850

-
- ¹¹² Levy, B.I., Benessiano, J., Henrion, D. et al. (1996):
Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure.
J Clin Invest 98: 418-425
- ¹¹³ Senbonmatsu, T., Ichihara, S., Price, E. et al. (2000):
Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload.
J Clin Invest 106: R25-29
- ¹¹⁴ Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Mezzano, S., Plaza, J.J., Egido, J. (2001):
Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field.
Hypertension 38: 1382-1387
- ¹¹⁵ Weiss, D., Sorescu, D., Taylor, W.R. (2001):
Angiotensin II and atherosclerosis.
Am J Cardiol 87 (suppl.): 25C–32C
- ¹¹⁶ Unger T. (2003):
Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade.
J Hyperten 21 (suppl. 6): S3-S7
- ¹¹⁷ Dai, W.J., Funk, A., Herdegen, T. et al. (1999):
Blockade of the Central Angiotensin AT1 Receptors Improves Neurological Outcome [...].
Stroke 30: 2391-2399
- ¹¹⁸ Mezzano, S.A., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. (2001):
Angiotensin II and renal fibrosis.
Hypertension 38 (3 Pt 2): 635-638
- ¹¹⁹ Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Egido, J. (2003):
Inflammation and angiotensin II.
Int J Biochem Cell Biol 35: 881-900
- ¹²⁰ De Mello, WC (2004).
Heart failure: how important is cellular sequestration? The role of the renin-angiotensin-aldosterone system.
J Mol Cell Cardiol 37: 431-438.
- ¹²¹ Peng, J., Gurantz, D., Tran, V. et al. (2002):
Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis.
Circ Res 91: 1119-1126.
- ¹²² Sleight, P. (2002):
Angiotensin II and trials of cardiovascular outcomes.
Am J Cardiol 89 (suppl.): 11A–17A
- ¹²³ Kaschina, E., Unger, T. (2003):
Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.
Blood Press 12: 70-88
- ¹²⁴ Funke-Kaiser, H., Steckelings, U.M., Unger, T. (2006):
Stimulation of AT2 receptors: role in the effect of angiotensin II receptor antagonists.
In: Angiotensin II Receptor Antagonists in Perspective (edited by Giuseppe Mancina), chapter 3 (page 31-46), second edition, Taylor & Francis (London)/ Informa UK Limited (Milton Park, Abingdon, Oxon), United Kingdom

-
- ¹²⁵ Levy, B.I. (2004):
Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease?
Circulation 109: 8-13
- ¹²⁶ Kaschina, E., Unger, T. (2003):
Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.
Blood Press 12: 70-88
- ¹²⁷ Carey, R.M. (2005):
Update on the role of the AT2 receptor.
Curr Opin Nephrol Hypertens 14: 67–71
- ¹²⁸ Zhang, J., Pratt, R.E. (1996):
The AT2 receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus.
J Biol Chem 271: 15026-15033
- ¹²⁹ Berk, B.C. (2003):
Angiotensin type 2 receptor (AT2R): a challenging twin.
Sci STKE pe16: 1-3
- ¹³⁰ Kenakin, T.:
Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction.
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1997
- ¹³¹ Feng, Y.H., Sun, Y., Douglas, J.G. (2002):
G β gamma -independent constitutive association of G α s with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1.
Proc Natl Acad Sci U S A 99: 12049-12054
- ¹³² Senbonmatsu, T., Saito, T., Landon, E.J. et al. (2003):
A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy.
EMBO J 22: 6471-6482
- ¹³³ Wruck, C.J., Funke-Kaiser, H., Pufe, T., Kusserow, H., Menk, M., Schefe, J.H., Kruse, M.L., Stoll, M., Unger, T. (2005):
Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 57-64
- ¹³⁴ Kaschina, E., Unger, T. (2003):
Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function.
Blood Press 12: 70-88
- ¹³⁵ Nouet, S., Amzallag, N., Li, J.M. et al. (2004):
Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor interacting protein, ATIP.
J Biol Chem 279: 28989–28997
- ¹³⁶ Corvol, P., Chauveau, D., Jeunemaitre, X., Menard, J. (1999):
Human renin inhibitor peptides.
Hypertension 16: 1-11
- ¹³⁷ Maibaum, J., Feldman, D.L. (2003):
Renin inhibitors as novel treatments for cardiovascular disease.
Expert Opin Ther Patents 13: 589-603
- ¹³⁸ Re, R.N. (2003):
Intracellular Renin and the Nature of Intracrine Enzymes.
Hypertension 42: 117-122
- ¹³⁹ Nguyen, G., Delarue, F., Burckle, C., Bouzahir, L., Giller, T. Sraer, J.D. (2002):

Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin.

J Clin Invest 109: 1417-1427

¹⁴⁰ Nguyen, G., Burckle, C.A., Sraer, J.D. (2004):
Renin/Prorenin–receptor biochemistry and functional significance.
Curr Hypertens Rep 6: 129-132

¹⁴¹ Ludwig, J., Kerscher, S., Brandt, U. et al. (1998):
Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffine granules.
J Biol Chem 273: 10939-10947

¹⁴² Nelson, N. and Harvey, W.R. (1999):
Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases.
Physiol Rev 79: 361-385

¹⁴³ Ramser, J., Abidi, F.E., Burckle, C.A. et al. (2005):
A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor.
Hum Mol Genet 14: 1019-10127

¹⁴⁴ Amsterdam, A., Nissen, R.M., Sun, Z. et al. (2004):
Identification of 315 genes essential for early zebrafish development.
Proc Natl Acad Sci U S A 101: 12792-12797

¹⁴⁵ Ichihara, A., Kaneshiro, Y., Takemitsu, T. et al. (2006):
Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension.
Hypertension 47: 894-900

¹⁴⁶ Ichihara, A., Kaneshiro, Y., Takemitsu, T., Suzuki, F., Nakagawa, T., Nishiyama, A., Iwata, H., Ishida, Y., Inagami, T., Saruta, T., Hayashi, M. (2005):
“Receptor-associated prorenin system” contributes to hypertensive end-organ damage.
J Hypertens 23 (suppl. 2): S78: P1.197

¹⁴⁷ Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y et al. (2004):
Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin.
J Clin Invest 114: 1128-1135

¹⁴⁸ Ichihara, A., Suzuki, F., Nakagawa, T. et al. (2006):
Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor–deficient mice.
J Am Soc Nephrol 17: 1950–1961

¹⁴⁹ Huang, Y., Wongamorntham, S., Kasting, J. et al. (2006):
Renin increases mesangial cell transforming growth factor- β 1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms.
Kidney Int 69: 105-113

¹⁵⁰ Burckle, C.A., Danser J.A.H., Muller, D.N. et al. (2006):
Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats.
Hypertension 47: 552-556

¹⁵¹ Kaneshiro, Y., Ichihara, A., Sakoda, M. et al. (2007):
Slowly progressive, angiotensin II-independent glomerulosclerosis in human (pro)renin receptor-transgenic rats.
J Am Soc Nephrol 18: 1789-1795

¹⁵² Stanton, A., Jensen, C., Nussberger, J., O’Brien, E. (2003):

Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren.
Hypertension 42: 1137-1143

¹⁵³ Stanton, A., Barton, J., Jensen, C. (2002):

Dose response antihypertensive efficacy of aliskiren (SPP 100), an orally active renin inhibitor.
Am J Hypertens 15 (4, suppl.): A56-A57

¹⁵⁴ Hershey, J.C., Steiner, B., Fischli, W. and Feuerstein, G. (2005):

Renin inhibitors: An antihypertensive strategy on the verge of reality.
Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 2: 181-185

¹⁵⁵ <http://www.finanznachrichten.de/nachrichten-2007-03/artikel-7856794.asp>

¹⁵⁶ <http://www.investor.reuters.wallst.com/stocks/company-profile.asp?rpc=66&ticker=NVS>

¹⁵⁷ Nussberger, J., Wuerzner, G., Jensen, C., Brunner, H.R. (2002):

Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor aliskiren (SPP100).
Hypertension 39: e1-e8

¹⁵⁸ Azizi M, Menard J, Bissery A, Guyenne TT, Bura-Riviere A, Vaidyanathan S, Camisasca RP (2004):

Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption.

J Am Soc Nephrol 15: 3126-33

¹⁵⁹ Juillerat-Jeanneret, L., Celerier, J., Chapuis Bernasconi, C. et al. (2004):

Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of human glioblastoma.

Br J Cancer 90: 1059-1068

¹⁶⁰ Costoya, J.A., Pandolfi, P.P. (2001)

The role of promyelocytic leukemia zinc finger and promyelocytic leukemia in leukemogenesis and development.

Curr Opin Hematol 8: 212-217

¹⁶¹ Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C. et al. (1998):

Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia.

Nature 391: 815-818

¹⁶² Glaser, K.B., Staver, M.J., Waring, J.F. et al. (2003):

Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: [...].

Mol Cancer Ther 2: 151-163

¹⁶³ Cook, M., Gould, A., Brand, N. et al (1995):

Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain.
Proc Natl Acad Sci U S A 92: 2249-2253

¹⁶⁴ Avantaggiato, V., Pandolfi, P.P., Ruthardt, M. et al. (1995):

Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization.

J Neurosci 15: 4927-4942

¹⁶⁵ Senbonmatsu, T., Saito, T., Landon, E.J. et al. (2003):

A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy.
EMBO J 22: 6471-6482

¹⁶⁶ Prusiner, S.B. (1998):

Prions.

Proc Natl Acad Sci U S A 95: 13363-13383

-
- ¹⁶⁷ Tuite, M.F. (2004):
The strain of being a prion.
Nature 428: 265-266
- ¹⁶⁸ Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O.B. et al. (2004):
Synthetic mammalian prions.
Science 305: 673-676
- ¹⁶⁹ Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., Soto, C. (2005):
In vitro generation of infectious scrapie prions.
Cell 121: 195-206:
- ¹⁷⁰ Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J. et al. (1989):
Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler-syndrome.
Nature 338: 342-345
- ¹⁷¹ Fiorino, A.S. (1996):
Sleep, genes and death: fatal familial insomnia.
Brain Res Brain Res Rev 22: 258-264
- ¹⁷² Gajdusek, D.C. (1977):
Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru.
Nature 197: 943-960
- ¹⁷³ Brown, P., Preece, M.A., Will, R.G. (1992):
"Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease.
Lancet 340: 24-27
- ¹⁷⁴ Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J. et al. (1996):
Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD.
Nature 383: 685-690
- ¹⁷⁵ Aguzzi, A., Polymenidou, M. (2004):
Mammalian prion biology. One century of evolving concepts.
Cell 116: 313-327
- ¹⁷⁶ Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A. et al. (1993):
Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.
Cell 73: 1339-1347
- ¹⁷⁷ Tremblay, P., Meiner, Z., Galou, M. et al. (1998):
Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates disease in mice.
Proc Natl Acad Sci USA 95: 12580-12585
- ¹⁷⁸ Singleton, A., Myers, A., Hardy, J. (2004):
The law of mass action applied to neurodegenerative disease: a hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex diseases.
Hum Mol Genet 13 (spec. no. 1): R123-126
- ¹⁷⁹ Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W.A. et al. (2002):
Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease.
Glia 40: 232-239
- ¹⁸⁰ Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J. et al. (2003):
Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis.
Science 302: 871-874
- ¹⁸¹ Croes, E.A., Dermaut, B., Houwing-Duistermaat, J.J. et al. (2003):
Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism.
Ann Neurol 54: 275-276

-
- ¹⁸² Golanska, E., Hulas-Bigoszewska, K., Rutkiewicz, E. et al. (2004):
Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD.
Neurology 62: 313-315
- ¹⁸³ Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C. et al. (2000):
Signal transduction through prion protein.
Science 289: 1925-1928
- ¹⁸⁴ Martins, V.R., Linden, R., Prado, M.A.M. et al. (2002):
Cellular prion protein: on the road for functions.
FEBS Lett 512: 25-28
- ¹⁸⁵ Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., LeBlanc, A. (2001):
Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis.
J Biol Chem 276: 39145-39149
- ¹⁸⁶ Nicotera, P. (2001):
A Route for prion neuroinvasion.
Neuron 31: 345-348
- ¹⁸⁷ Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P. et al. (2003):
Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery.
J Biol Chem 278: 9064-9072
- ¹⁸⁸ Schneider, B., Mutel, V., Pietri, M. et al. (2003):
NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells.
Proc Natl Acad Sci U S A 100: 13326-13331
- ¹⁸⁹ Guentchev, M., Siedlak, S.L., Jarius, C. et al. (2002):
Oxidative damage to nucleic acids in human prion disease.
Neurobiol Dis 9: 275-281
- ¹⁹⁰ Bendheim, P.E., Brown, H.R., Rudelli, R.D. et al. (1992):
Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein.
Neurology 42: 149-156
- ¹⁹¹ Liao, Y.C., Lebo, R.V., Clawson, G.A., Smuckler, E.A. (1986):
Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications.
Science 233: 364-367
- ¹⁹² Lemaire-Vieille, C., Schulze, T., Podevin-Dimster, V. et al. (2000):
Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice.
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 5422-5427
- ¹⁹³ Trifilo, M.J., Yajima, T., Gu, Y. et al. (2006):
Prion-induced amyloid heart disease with high blood infectivity in transgenic mice.
Science 313: 94-97
- ¹⁹⁴ Ashwath, M.L., Dearmond, S.J., Culclasure, T. (2005):
Prion-associated dilated cardiomyopathy.
Arch Intern Med 165: 338-340
- ¹⁹⁵ Lemaire-Vieille, C., Schulze, T., Podevin-Dimster, V. et al. (2000)
Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice.
Proc Natl Acad Sci USA 97: 5422-5427

-
- ¹⁹⁶ Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P. et al. (1999):
Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents.
Proc Natl Acad Sci USA 96:4046–4051
- ¹⁹⁷ Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Holliman, A. et al. (1998):
Determination of frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid [...] in scrapie-affected sheep and mice.
Vet Rec 142: 534–537
- ¹⁹⁸ Hanson, R.D., Connolly, N.L., Burnett, D. et al. (1990):
Developmental regulation of the human cathepsin G gene in myelomonocytic cells.
J Biol Chem 265: 1524 –1530
- ¹⁹⁹ Sambrano, G.R., Huang, W., Faruqi, T. et al. (2000):
Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets.
J Biol Chem 275: 6819–6823
- ²⁰⁰ Weksler, B.B., Jaffe, E.A., Brower, M.S. et al. (1989):
Human leukocyte cathepsin G and elastase specifically suppress thrombin-induced prostacyclin production in human endothelial cells.
Blood 74: 1627–1634
- ²⁰¹ Duprez, D.A. (2006):
Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review.
J Hypertens 24: 983-991
- ²⁰² Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R. (2006):
Physiology of local renin-angiotensin systems.
Physiol Rev 86: 747-803
- ²⁰³ Funke-Kaiser, H., Paul, M. (2002):
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antidiabetic agents, antihypertensive agents and lipid lowering drugs. In: Diabetes and Cardiovascular Risk (Edited by Eberhard Ritz), pages 312-347, Academy, Cologne, Germany
- ²⁰⁴ Unger, T. (2002):
The role of the renin–angiotensin system in the development of cardiovascular disease.
Am J Cardiol 89 (suppl.): 3A-9A
- ²⁰⁵ Herrmann, S.-M., Funke-Kaiser, H., Schmidt-Petersen, K., Nicaud, V., Gautier-Bertrand, M., Evans, A., Kee, F., Arveiler, D., Morrison, C., Orzechowski, H.-D., Elbaz, A., Amarenco, P., Cambien, F., Paul, M. (2001):
Characterization of polymorphic structure of cathepsin G gene.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 21: 1538-1543
- ²⁰⁶ Trimarchi, J.M., Lees, J.A. (2002):
Sibling rivalry in the E2F family.
Nat Rev Mol Cell Biol 3: 11-20
- ²⁰⁷ Weinberg, R.A. (1996):
E2F and cell proliferation: A world turned upside down.
Cell 85: 457-459
- ²⁰⁸ Funalot, B., Courbon, D., Brousseau, T. et al. (2004):
Genes encoding endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-1 interact to influence blood pressure in women: The EVA study.
J Hypertension 22: 739-743
- ²⁰⁹ Funalot, B., Ouimet, T., Claperon, A. et al. (2004):

Endothelin-converting enzyme-1 is expressed in human cerebral cortex and protects against Alzheimer's disease.

Mol Psychiatry 9: 1122-1128

²¹⁰ Mohandas, T., Sparkes, R.S., Shapiro, L.J. (1981):

Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. Science 211: 393-396

²¹¹ Barlow, D.P. (1995):

Gametic imprinting in mammals.

Science 270: 1610-1613

²¹² Yoder, J.A., Walsh, C.P., Bestor, T.H. (1997):

Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.

Trends Genet 13: 335-340

²¹³ Baylin, S.B., Herman, J.G. (2000):

DNA hypermethylation in tumorigenesis.

Trends Genet 16: 168-174

²¹⁴ Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004):

Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.

Nature 429: 457-463

²¹⁵ Levenson, J.M., Sweatt, J.D. (2005):

Epigenetic mechanisms in memory formation.

Nat Rev Neurosci 6: 108-118

²¹⁶ Szyf, M., Weaver, I.C.G., Champagne, F.A. et al. (2005):

Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat.

Front Neuroendocrinol 26: 139-162

²¹⁷ Jones, P.A., Takai, D. (2001):

The role of DNA methylation in mammalian epigenetics.

Science 293: 1068-1070

²¹⁸ Ng, H.-H., Bird, A. (1999):

DNA methylation and chromatin modification.

Curr Opin Genet Dev 9: 158-163

²¹⁹ Ballestar, E., Wolffe, A.P. (2001):

Methyl-CpG-binding proteins.

Eur J Biochem 268: 1-6

²²⁰ Wade, P.A. (2001):

Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression.

Bioessays 23: 1131-1137

²²¹ Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E. et al. (2000):

Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.

N Engl J Med 343: 1350-1354

²²² Yao, X., Hu, J.-F., Daniels, M. et al. (2003):

A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma.

J Clin Invest 111: 265-273

²²³ Laird, P.W. (2005):

Cancer epigenetics.

Hum Mol Genet 14 (spec. no. 1): R65-R76

²²⁴ McKinsey, T.A., Olson, E.N. (2005):
Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes.
J Clin Invest 115: 538-546

²²⁵ Bogdarina, I., Welham, S., King, P.J. et al. (2007):
Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension.
Circ Res 100: 520-526

²²⁶ International Human Genome Sequencing Consortium (2001):
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 409: 860-921

²²⁷ Butler, J.E.F., Kadonaga, J.T. (2002).
The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression.
Genes Dev 16: 2583-2592

²²⁸ Ballestar, E., Wolffe, A.P. (2001):
Methyl-CpG-binding proteins.
Eur J Biochem 268: 1-6

²²⁹ Koreth, J., O'Leary, J.J., McGee, J. (1996):
Microsatellites and PCR genomic analysis.
J Pathol 178: 239-48

²³⁰ Ober, C., Aldrich, C.L., Chervoneva, I. et al. (2003):
Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates.
Am J Hum Genet 72: 1425-1435

²³¹ Murrell, A., Rakyar, V.K., Beck, S. (2005):
From genome to epigenome.
Hum Mol Genet 14 (spec. no. 1): R3-R10

²³² Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E. et al. (2003):
Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene.
Science 301: 386-389

²³³ Caspi, A., McClay, J., Moffitt, T.E. et al. (2002):
Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children.
Science 297: 851-854

²³⁴ Szyf, M., Weaver, I.C.G., Champagne, F.A. et al. (2005):
Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat.
Front Neuroendocrinol 26: 139-162

²³⁵ Levenson, J.M., Sweatt, J.D. (2005):
Epigenetic mechanisms in memory formation.
Nat Rev Neurosci 6: 108-118

²³⁶ Ulrey, C.L., Liu, L., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. (2005):
The impact of metabolism on DNA methylation.
Hum Mol Genet 14 (spec. no. 1): R139-R147

²³⁷ Redon, R., Ishikawa, S, Fitch, K.R. et al. (2006):
Global variation in copy number in the human genome.
Nature 444: 444-454

²³⁸ Shianna, K.V. and Willard, H.F. (2006):
In search of normality.

Nature 444: 428-429

- ²³⁹ Metivier, R., Penot, G., Hübner, M.R. et al. (2003):
Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter.
Cell 115: 751-763
- ²⁴⁰ Alvarez, M., Rhodes, S.J., Bidwell, J.P. (2003):
Context-dependent transcription: all politics is local.
Gene 313: 43-57
- ²⁴¹ Kosak, S.T. and Groudine, M. (2004):
Gene order and dynamic domains.
Science 306: 644-647
- ²⁴² Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E. et al. (2004):
Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription.
Nat Genet 36: 1065-1071
- ²⁴³ Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A. (2004):
Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy.
Nature 429: 457-463
- ²⁴⁴ Minucci, S., Pelicci, P. G. (2006):
Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer.
Nat Rev Cancer 6: 38-51
- ²⁴⁵ Ohno, M., Fornerod, M. and Mattaj, I.W. (1998):
Nucleocytoplasmic transport: The Last 200 nanometers.
Cell 92: 327-336
- ²⁴⁶ Brivanlou, A.H., Darnell, J.E. (2002):
Signal transduction and the control of gene expression.
Science 295: 813-818
- ²⁴⁷ Maniatis, T. and Reed, R. (2002):
An extensive network of coupling among gene expression machines.
Nature 416: 499-506
- ²⁴⁸ Werner, T., Fessele, S., Maier, H., Nelson, P.J. (2003):
Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation.
FASEB J. 17: 1228-12237
- ²⁴⁹ Hofmann, K.P., Spahn, C.M.T., Heinrich, R., Heinemann, U. (2006):
Building functional modules from molecular interactions.
Trends Biochem Sci 31: 497-508
- ²⁵⁰ Barabási, A.L., Oltvai, Z.N. (2004):
Network biology: Understanding the cell's functional organization.
Nat Rev Genet 5: 101-113
- ²⁵¹ Biggar, S.R., Crabtree, G.R. (2001):
Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses.
EMBO J 20: 3167-3176
- ²⁵² Blake, W.J., Kaern, M., Cantor, C.R., Collins, J.J. (2003):
Noise in eukaryotic gene expression.
Nature 422: 633-637
- ²⁵³ Rich, S., McLaughlin, V.V. (2003):
Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease.

Circulation 108: 2184-2190

²⁵⁴ Eickelberg, O., Seeger, W. (2005):
Pulmonale Hypertonie.
Der Internist 7: 759-767

²⁵⁵ Giaid, A. (1998):
Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension.
Chest 114 (3 suppl.): 208S-212S

²⁵⁶ Jeng, A.Y. (2003):
Utility of endothelin-converting enzyme inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases.
Curr Opin Investig Drugs 4: 1076-1081

²⁵⁷ Kirshbom, P.M., Tsui, S.S., DiBernardo et al. (1995):
Blockade of endothelin-converting enzyme reduces pulmonary hypertension after cardiopulmonary
bypass and circulatory arrest.
Surgery 118: 440-444

²⁵⁸ Kwan, A.L., Lin, C.L., Chang, C.Z. et al. (2002):
Oral administration of an inhibitor of endothelin-converting enzyme attenuates cerebral vasospasm
following experimental subarachnoid haemorrhage in rabbits.
Clin Sci (Lond) 103 (suppl. 48): 414S-417S

²⁵⁹ Minamino, T., Kurihara, H.K., Takahashi, M., Shimada, K. et al. (1997):
Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human
atherosclerosis.
Circulation 95: 221-230

²⁶⁰ Dickstein, K., De Voogd, H.J., Miric, M.P. et al. (2004):
Effect of single doses of SLV306, an inhibitor of both neutral endopeptidase and endothelin-
converting enzyme, on pulmonary pressures in congestive heart failure.
Am J Cardiol 94: 237-239

²⁶¹ Kwan, A.L., Lin, C.L., Chang, C.Z. et al. (2002):
Attenuation of SAH-induced cerebral vasospasm by a selective ECE inhibitor.
Neuroreport 13: 197-199

²⁶² Emoto, N., Nurhantari, Y., Alimsardjono, H. et al. (1999):
Constitutive lysosomal targeting and degradation of bovine endothelin-converting enzyme-1a
mediated by novel signals in its alternatively spliced cytoplasmic tail.
J Biol Chem 274: 1509-1518

²⁶³ Barnes, K., Shimada, K., Takahashi, M., Tanzawa, K., Turner, A.J. (1996):
Metalloproteinase inhibitors induce an up-regulation of endothelin-converting enzyme levels and its
redistribution from the plasma membrane to an intracellular compartment.
J Cell Science 109: 919-928

²⁶⁴ Barnes, K., Walkden, B.J., Wilkinson, T.C. et al. (1997):
Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its
localization in rat hippocampus.
J Neurochem 68: 570-577

²⁶⁵ Shao, B., Yan, W., Rockey, D.C. (1999):
Regulation of Endothelin-1 Synthesis by Endothelin-converting Enzyme-1 during wound healing.
J Biol Chem 274: 3228-3234

²⁶⁶ Ergul, A., Grubbs, A.L., Zhang, Y., Spinale, F.G. (2000):
Selective upregulation of endothelin converting enzyme-1a in the human failing heart.
J Card Fail 6: 314-320

-
- ²⁶⁷ Grubbs, A.L., Anstadt, M.P., Ergul, A. (2002):
Saphenous vein endothelin system expression and activity in african american patients.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 22: 1122-1127
- ²⁶⁸ Orzechowski, H.-D., Günther, A., Menzel, S. et al. (2001):
Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells.
Mol Pharmacol 60: 1332-1342
- ²⁶⁹ Funke-Kaiser, H., Thomas, A., Kovacevic, S.D. et al. (2003):
Regulation of the major isoform of human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1c) by a strong housekeeping promoter modulated by polymorphic microsatellites.
J Hypertens 21: 2111–2124
- ²⁷⁰ Corder, R., Barker, S. (1999):
The expression of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) are independently regulated in bovine aortic endothelial cells.
J Cardio Pharmacol 33: 671-677
- ²⁷¹ Webb, D.J. (1995):
Endogenous endothelin generation maintains vascular tone in humans.
J Hum Hypertens 9: 459-63
- ²⁷² Berton, O., Nestler, E.J. (2006):
New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines.
Nat Rev Neurosci 7: 137-151
- ²⁷³ Wan, Y., Wallinder, C., Plouffe, B. et al. (2004):
Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist.
J Med Chem 47: 5995-6008
- ²⁷⁴ Grzesiak, A., Kaschina, E., Curato, C., Steckelings, U.M., Hallberg, A., Li, J., Unger, T.:
The angiotensin at₂ receptor agonist compound 21 improves heart function after myocardial infarction in the rat.
17th scientific meeting of the European Society of Hypertension (ESH), June 15-19, 2007, Milan, Italy. Oral presentation 1228.
- ²⁷⁵ Seibold, S., Rudroff, C., Weber, M. et al. (2003):
Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22.
FASEB J 17: 1180-1182
- ²⁷⁶ Mallucci, G., Collinge, J. (2004):
Update on Creutzfeldt-Jakob disease.
Curr Opin Neurol 17: 641-647
- ²⁷⁷ Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T. et al. (1996):
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.
Nature 380: 639-642
- ²⁷⁸ Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N. et al. (1996):
Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene.
Nature 380: 528-531
- ²⁷⁹ Genoud, N., Behrens, A., Miele, G. et al. (2004):
Disruption of Doppel prevents neurodegeneration in mice with extensive Prnp deletions
Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4198-4203
- ²⁸⁰ Emery, J.G., Ohlstein, E.H., Jaye, M. (2001):
Therapeutic modulation of transcription factor activity.
Trends Pharmacol Sci 22: 233-240

-
- ²⁸¹ Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W. (2000):
Roles of PPARs in health and disease.
Nature 405: 421-424
- ²⁸² Mann, M.J., Whittemore, A.D., Donaldson, M.C. et al. (1999):
Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy:
the PREVENT single-centre, randomised controlled trial.
Lancet 354: 1493-1498
- ²⁸³ Bielinska, A., Shivdasani, R.A., Zhang, L., Nabel, G.L. (1990):
Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides.
Science 250: 997-1000
- ²⁸⁴ Beerli, R.R., Dreier, B., Barbas, C.F. (2000):
Positive and negative regulation of endogenous genes by designed
transcription factors.
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 1495-1500
- ²⁸⁵ Janowski, B.A., Huffman, K.E., Schwartz, J.C. et al. (2005):
Inhibiting gene expression at transcription start sites in chromosomal DNA with antigene RNAs.
Nat Chem Biol 1: 216-222
- ²⁸⁶ Park, G.Y., Christman, J.W. (2006):
Nuclear factor kappa B is a promising therapeutic target in inflammatory lung disease.
Curr Drug Targets 7: 661-668
- ²⁸⁷ Lavrovsky, Y., Tyagi, R.K., Chen, S. et al. (1999):
Ribozyme-mediated cleavage of the estrogen receptor messenger RNA and inhibition of receptor
function in target cells.
Mol Endocrinol 13: 925-934
- ²⁸⁸ Buchini, S. and Leumann, C.J. (2003):
Recent improvements in antigene technology.
Curr Opin Chem Biol 7: 717-726
- ²⁸⁹ Guntaka, R.V., Varma, B.R., Weber, K.T. (2003):
Triplex-forming oligonucleotides as modulators of gene expression.
Int J Biochem Cell Biol 35: 22-31