

Lukas Adrian

Dr. med.

Transkriptionelle Regulation von S100A1 im Herzmuskel

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Patrick Most

Die zentrale Rolle des Proteins S100A1 in der Entstehung der Herzinsuffizienz und der positive Effekt einer Reexpression im geschädigten Herzen machen es zu einem besonders interessanten Ziel für die Entwicklung neuer Therapieverfahren. Die plastische Expression während der Embryonalentwicklung und bei der Entstehung der Herzinsuffizienz legen transkriptionelle Mechanismen nahe. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von transkriptionellen Regulatoren der S100A1-Expression und die Charakterisierung der Interaktion mit dem S100A1-Promotor, um erste Einblicke in die Regulation von S100A1 im Herzen zu erlangen.

Die H9c2-Zelllinie wurde im Rahmen der dieser Arbeit vorausgehenden Arbeit charakterisiert und als geeignetes Modell einer positiven S100A1-Expression beschrieben. Als embryonale Kardiomyoblasten-ähnliche Zelllinie zeigen H9c2-Zellen einen Anstieg der S100A1-Expression während der Ausdifferenzierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen. Im Rahmen der Vorarbeit wurde diese Eigenschaft genutzt, um potenziell regulierende Transkriptionsfaktoren mittels Next-Generation-Sequencing und einer bioinformatischen Analyse zu identifizieren, was den Ausgangspunkt dieser Arbeit darstellte.

Die zur Verfügung gestellte Liste von 31 potenziell regulatorischen Transkriptionsfaktoren wurden zunächst auf ihre kardiale Relevanz und ihre Eignung für das H9c2-Zellkulturmodell untersucht und entsprechend gefiltert. Zur Validierung der eingegrenzten Kandidaten wurden Perturbationsexperimente mit siRNA in H9c2-Zellen durchgeführt. Identifiziert wurden so zwei potenzielle Inhibitoren (FOXP1, SP1) und vier potenzielle Aktivatoren (STAT3, STAT1, KLF6, EGR1) der S100A1-Expression in H9c2-Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion der Transkriptionsfaktoren mit dem S100A1-Promotor und zum Nachweis einer direkt-regulatorischen Funktion wurden DNA-Sequenzen upstream und downstream des Transkriptionsstarts auf Bindestellen der identifizierten Transkriptionsfaktoren untersucht. Der Transkriptionsstart wurde mittels 5'-RACE bestimmt und im Anfangsbereich des Exons 1 identifiziert. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden

Promotorfragmente generiert, die aufeinander aufbauend Gruppen von vorhergesagten Transkriptionsfaktor-Bindestellen einschließen. Für das längste Fragment etwa 2000 Basenpaare Upstream des Transkriptionsstartes konnte eine ähnliche transkriptionelle Dynamik wie für den nativen S100A1-Promotor gezeigt werden. Außerdem wurden zwei STAT3-Bindestellen identifiziert, die die aktivatorische Rolle von STAT3 in dem Promotor-Fragment und im nativen S100A1-Promotor zu vermitteln scheinen. Der Effekt war in einem kürzeren Fragment ohne diese Bindestellen nicht mehr nachweisbar, sodass eine direkte Interaktion mit diesen Bindestellen wahrscheinlich ist.

Mit abnehmender Fragmentlänge zeigte sich eine zunehmende transkriptionelle Aktivität der Promotor-Abschnitte. Die Untersuchung von FOXP1- und SP1/KLF6-Bindestellen im kürzeren Fragment 3 mittels siRNA-Knockdown und ortsspezifische Mutagenese zeigte Effekte auf die transkriptionelle Aktivität, die teilweise nicht mehr mit der Funktion der Faktoren auf die S100A1-Expression im nativen Genlocus in H9c2-Zellen übereinstimmen. Einerseits könnte dies durch die Präsenz weiterer regulatorische Elemente, möglicherweise auch in räumlicher Trennung zum S100A1-Promotor erklärt werden, die in dem verwendeten Modell nicht abgebildet werden können. Andererseits kann aber auch argumentiert werden, dass mit abnehmender Fragmentlänge der Einfluss von immer weiteren regulatorischen Elementen wegfällt und die kleineren Fragmente somit die native S100A1-Promotorfunktion immer weniger widerspiegeln. Dennoch lässt sich eine Interaktion dieser Faktoren mit den Bindestellen anhand der vorliegenden Ergebnisse diskutieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die gewählten Methoden die Identifizierung von Transkriptionsfaktoren für das S100A1-Gen möglich ist. Als direkter Aktivator der S100A1-Expression mit wahrscheinlicher Bindung im S100A1-Promotor konnte STAT3 identifiziert werden. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren FOXP1 und KLF6 im S100A1-Promotor ist wahrscheinlich. Eine regulatorische Funktion konnte außerdem für die Faktoren SP1, STAT1 und EGR1 gefunden werden. Für die weitere Charakterisierung des Bindungsverhaltens der identifizierten Transkriptionsfaktoren ist die Durchführung weiterführender Experimente, beispielsweise von Chromatin-Immunopräzipitation notwendig. Auch muss an dieser Stelle erneut betont werden, dass es sich bei den ausgewählten Transkriptionsfaktoren nur um eine Auswahl handelt und weitere potenzielle Transkriptionsfaktoren ebenfalls untersucht werden sollten. Mit dem Ziel neuer therapeutischer Ansätze in der Behandlung der Herzinsuffizienz sollte die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von S100A1 im Herzmuskel fortgeführt werden.