

Meike Schrader

Dr. med.

Validation of DNA regulatory elements in the S100A1 promoter region with CRISPRinterference

Fach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. Patrick Most

S100A1 ist ein Kalzium-bindendes Protein, welches vor allem in Herzmuskelzellen exprimiert wird. Seine Funktion besteht als Regulator der Stressantwort in der Anpassung der kardialen Funktion an Belastung. Während der Entwicklung vom embryonalen zum adulten Herzen steigen die S100A1 mRNA- und Proteinlevel kontinuierlich an, bis sie ein Plateau erreichen. Während ein erneuter Anstieg als Reaktion der Herzmuskelzellen auf Belastung im Stadium der kompensierten Hypertrophie die Herzfunktion weitgehend erhalten kann, scheint ein wesentliches Merkmal der dekompenzierten Herzinsuffizienz ein Abfall der S100A1 Expression zu sein. Ein AAV-Gentransfer führte im Tiermodell zwar zu einer deutlich verbesserten Pumpfunktion, jedoch konnte der molekulare Mechanismus der pathologischen Plastizität von S100A1 bisher nicht identifiziert werden. Mittels CRISPRi, einer Methode für die sequenzspezifische Untersuchung der Genregulation auf DNA-Ebene, wurden die an der Regulation von S100A1 beteiligten DNA-Bereiche untersucht. Zunächst wurde dafür in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die Lokalisation des Transkriptionsstarts verifiziert. Mittels einer bioinformatischen Analyse konnte die Promotorregion anhand des Vorliegens von Transkriptionsfaktor-Bindestellen identifiziert werden. Mittels NGS wurden anschließend diejenigen Transkriptionsfaktoren selektiert, die eine Expressionsänderung, während der mit der Ausdifferenzierung von H9c2-Zellen verbundenen Hochregulation von S100A1 zeigen. In Perturbationsexperimenten mit siRNA konnten die identifizierten Transkriptionsfaktoren validiert werden. Aufgrund der Störanfälligkeit von RNAi und der möglichen unspezifischen Wirkung, wurden die in Vorarbeiten beschriebenen regulatorischen DNA-Bereiche mittels CRISPRi bestätigt. Der Komplex aus guide-RNA und einer an sie bindenden, durch Mutation katalytisch inaktiven, Cas9-Variante verhindert durch sterische Kompetition die Transkription der DNA. Um die konstruierten gRNAs zu validieren, wurden diese zunächst per liposomaler Transfektion in die Zellen eingebracht. Ein adenoviraler Vektor wurde für den effiziente Transfer der dCas9 produziert. Die Beobachtung einer hohen Zelltoxizität dieser Kombination führte zu einem Strategiewechsel hin zu einer doppelten viralen Transduktion mit Adenovirus und AAV. Die Mehrzahl der konstruierten gRNAs führte zu einer signifikanten Repression von S100A1 in H9c2-Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Machbarkeitsstudie sollen im Folgenden auf die Aktivierung der S100A1 Expression in einem Modell kardialer Hypertrophie übertragen werden. Somit dienen die identifizierten regulatorischen Bereiche als Grundlage für einen Therapieansatz, mit welchem sich der pathologische Abfall des positiv inotropen, lusitropen und anti-arrhythmogenen Proteins verhindern ließe.