

8 ZUSAMMENFASSUNG

Die übergeordnete Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, globale Einsichten in die Rolle von Histon-Modifikationen sowie in ihre möglichen Interaktionen mit vier Schlüssel-Transkriptionsfaktoren (TFs) im Kontext von Herz-Entwicklung und entwicklungsbedingter Herz-Erkrankung zu erhalten. Histon-Modifikationen beeinflussen maßgeblich den Grad der Kompaktierung von Chromatin und damit auch die Zugänglichkeit der DNA. Transkriptionsfaktoren dagegen sind für die Feinjustierung der Expression verantwortlich. Auf beiden Ebenen agieren Hunderte von Faktoren, von denen viele sicherlich noch unbekannt sind, noch weniger geklärt jedoch ist das Zusammenspiel dieser regulatorischen Ebenen. Um Einsichten in diese Prozesse zu erlangen, wurden vier Faktoren auf jeder Ebene ausgewählt, also vier Histon-Modifikationen und vier Transkriptionsfaktoren. Da Herzfehlbildungen das häufigste Krankheitsbild bei Neugeborenen sind, ist es besonders wichtig, die Prozesse zu verstehen, von denen die Herzentwicklung gesteuert wird. Daher wurden Herz- und Skelettmuskelzellen in dieser Studie als Modellsysteme verwendet.

Gemäß der *Histon Code Hypothese* sollten verschiedene Kombinationen von Histon-Modifikationen zu unterschiedlichen transkriptionellen Ergebnissen führen. Diese Hypothese wurde an Hand von den vier Histon-Modifikationen H3ac, H4ac, H3K4me2 und H3K4me3 in undifferenzierten und differenzierten Skelettmuskel Zellen sowie in Kardiomyozyten untersucht. Die Lokalisierung und die Kombinatorik ihres Auftretens wurden mittels Chromatin-Immunopräzipitation und einer anschließenden Analyse auf maßgeschneiderten Arrays ermittelt, welche die 12.625 Transkription-Starts von 8.585 murinen Genen repräsentieren. Diese Information wurde mit den Ergebnissen einer Expressionsanalyse der gleichen Gene kombiniert. Die Designs der Arrays, das Software-Paket für die Auswertung, die Rohdaten und eine Datendank der Ergebnisse wurden über das Internet allgemein zugänglich gemacht. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass die durchschnittlichen Expressionswerte, die mit Kombinationen von Modifikationen einher gehen, sich nicht einfach aus den Expressionswerten der Gene, die mit einzelnen Modifikationen assoziiert sind, ableiten lassen. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass sie vielmehr einen spezifischen *Code* bilden: Verschiedene Kombinationen von Histon-Modifikationen sind mit signifikant unterschiedlichen Expressionswerten verknüpft, und das Expressionsniveau der Kombinationen ergibt sich nicht als Summe der Expressionsniveaus, die mit den einzelnen Modifikationen assoziiert sind.

Die Dynamik der Histon-Modifikationen während des Differenzierungsprozesses innerhalb einer Zelllinie wurde untersucht. Das Auftreten von neuen Modifikationen war als

solches nicht mit höheren Expressionswerten assoziiert. Dies unterstützt die Auffassung, dass Histon-Modifikationen eher eine Voraussetzung denn eine ausreichende Triebkraft oder notwendige Konsequenz des transkriptionellen Prozesses sind. Weiterhin suggeriert diese Beobachtung, dass Histon-Modifikationen eine wichtige Rolle als Signale für die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren spielen könnten.

Vier Transkriptionsfaktoren, die bekanntermaßen notwendig für die korrekte Entwicklung des Herzens sind, wurden in Kardiomyozyten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Gata4, Mef2a, Nkx2.5 und Srf ein regulatorisches Teilnetzwerk bilden, in dem sie sich gegenseitig sowie eine hohe Zahl von Zielgenen ko-regulieren. In dieser Studie wird ein umfangreicher Katalog der Zielgene dieser wichtigen Regulatoren der Herzentwicklung vorgestellt. Da zahlreiche Zielgene selbst wieder als Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten, ist anzunehmen, dass Gata4, Mef2a, Nkx2.5 und Srf am Beginn von mehreren regulatorischen Kaskaden plaziert werden können. An Hand der Analyse der Bindungssequenzen wurden die bekannten Bindungsmotive verfeinert sowie bislang unbekannte Motive identifiziert, womit neue Hilfsmittel für die Vorhersage von weiteren Zielgenen geschaffen werden konnten.

Die Funktionalität der Transkriptionsfaktor-Bindung wurde untersucht, indem die Daten mit Expressionsdaten von Zellen kombiniert wurden, in denen via RNA-Interferenz die Proteinmengen der Transkriptionsfaktoren reduziert worden waren. Jeder der vier Transkriptionsfaktoren aktiviert die Expression der meisten seiner Zielgene. Im Falle von Gata4 und Srf ist dieses aktivierende Potential sogar noch verstärkt an Bindungsstellen, die darüber hinaus noch durch Acetylierung von Histon 3 charakterisiert sind. Möglicherweise ist dies eine Konsequenz der Interaktion von Gata4 bzw. Srf mit der Histonacetyltransferase p300. Insgesamt befanden sich etwa 80% der Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren in Bereichen, wo auch eine Modifizierung der Histone festgestellt werden konnte - ein weiterer Hinweis, dass ihnen Signalfunktionen bei der Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren zukommen könnten. Da jedoch auch die einzelnen Modifikationen sehr oft gemeinschaftlich auftreten, werden weitere Studien notwendig sein, um die Mechanismen der Interaktion genauer aufzuklären.

Die Stärke des verwendeten experimentellen Ansatzes konnte am Beispiel von Tbx20 verdeutlicht werden. Vorher waren die Mechanismen unbekannt, von denen die Expression dieses essentiellen T-box Transkriptionsfaktors im Herzen gesteuert wird. Nun konnte gezeigt werden, dass sowohl der Promoter als auch das erste Intron dieses Gens zwar im Herzen, nicht jedoch in Skelettmuskelzellen, durch die spezifischen Histon-Modifikationen H3ac,

H4ac, H3K4me2 und H3K4me3 markiert sind. An den Positionen, wo diese Modifikationen am stärksten angereichert wurden, konnten auch je drei Bindungsstellen von Gata4, Mef2a, Nkx2.5 und Srf identifiziert werden. Es konnte ferner gezeigt werden, dass jede der Bindungsstellen auch das entsprechende Bindungsmotiv mindestens einmal enthält. Durch Knockdown-Experimente mittels RNA-Interferenz wurde der Nachweis erbracht, dass die Bindungen auch funktional sind und dass Gata4, Mef2a, Nkx2.5 und Srf jeweils die Expression von *Tbx20* aktivieren.

