

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. Paul

Differentielle Regulation der alternativen Promotoren des Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 durch den kardialen Transkriptionsfaktor Nkx2.5

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Julia Lemmer

aus: Frankfurt am Main

Referent: Prof. Dr. med. M. Paul

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Rosenthal

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien
Universität Berlin.

Promoviert am: 13.12.2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kurze Übersicht über die Physiologie der Herzentwicklung und die Rolle der Neuralleiste in der embryonalen Entwicklung	2
1.2	Das Endothelinsystem - seine Rolle in Physiologie, Pathophysiologie und embryonaler Entwicklung	5
1.3	Nkx2.5 – ein essentieller Faktor der Kardiogenese	12
2	Fragestellung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Zellkultur	17
3.2	Rattenembryonen – Herzanlagen	17
3.3	Humanes Gewebe	18
3.4	Gewebepräparation	20
3.4.1	RNA-Isolierung	20
3.4.2	Protein-Extraktion	21
3.5	Molekularbiologische Methoden	22
3.5.1	RT-PCR	22
3.5.2	PCR mit cDNA als Matrize	23
3.5.2.1	Allgemeine Reaktionsbedingungen	26
3.5.2.2	Verwendete Primer	27
3.5.3	Subklonierung	29
3.5.3.1	Sonden für den RNase Protection Assay (RPA)	31
3.5.3.2	Expressionsvektoren	32
3.5.3.3	Wildtyp-Promotor-Reporter-Konstrukte	32
3.5.4	Site-directed Mutagenese	32
3.5.5	Ribonuclease-Protection-Assay (RPA)	34
3.5.6	Western-Blot	40

II

3.5.7	Bandshift-Analyse (Electromobility Shift Assay [EMSA], Gelshift)	42
3.5.8	Promotor-Reporter-Assays/ Transiente Transfektion	47
3.6	Statistik	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Ergebnisse der RT/PCR	50
4.1.1	RT/PCR mit cDNA von H9c2-Zellen als Matrize	50
4.1.2	RT/PCR mit cDNA von Rattenherzanlagen als Matrize	52
4.1.3	RT-PCR mit cDNA von humanen Gewebeproben als Matrize	54
4.2	Ergebnisse des RPA	59
4.2.1	RPA mit H9c2-Kardiomyoblasten-RNA	59
4.2.2	RPA mit RNA aus humanen Gewebeproben	61
4.3	Western-Blot	62
4.4	Ergebnisse der Transfektionsexperimente bezüglich der verschiedenen ECE-1-Promotoren	63
4.4.1	Konsensussequenzen für den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 in den alternative ECE-1-Promotoren	63
4.4.2	Interaktion von ECE-1a – Promotor und Nkx2.5	63
4.4.3	Interaktion von ECE-1b-Promotor und Nkx2.5	66
4.4.4	Interaktion von ECE-1c-Promotor und Nkx2.5	68
4.5	Bandshift-Analyse	69
4.5.1	Ergebnisse der Bandshift-Analyse	69
4.5.1.1	Bandshift-Analyse mit Kernproteinen	69
4.5.1.2	Bandshift-Analyse mit zytosolischen Proteinen	69
4.5.1.3	Bandshift-Analyse mit rekombinantem Protein	70
5	Diskussion	72
5.1	Einleitende Bemerkungen	72
5.2	Die Bedeutung von ECE-1 und Nkx2.5 für die Herzentwicklung	73

III

5.3	Koexpression von ECE-1 und Nkx2.5: Voraussetzung einer möglichen Interaktion	75
5.3.1	Koexpression in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2	75
5.3.2	Koexpression in der embryonalen Herzanlage der Ratte	76
5.3.3	Kardiale Koexpression bei Patienten mit kongenitalen Herzfehlern	76
5.4	Funktionelle Interaktion von ECE-1 und Nkx2.5 in vitro	77
5.5	Funktionelle Interaktion von ECE-1 und Nkx2.5 in vivo?	80
5.6	Folgerungen	83
6	Zusammenfassung	86
7	Literaturverzeichnis	88

6 Zusammenfassung

Die fundamentale Bedeutung des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 und dem Endothelin-Konvertierungsenzym-1 (ECE-1), für die Herzentwicklung konnte in zahlreichen Knock-out-Modellen der Maus gezeigt werden. In dieser Arbeit gelang zum ersten Mal der Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen Nkx2.5 und ECE-1.

Als Voraussetzung einer Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5 und den alternativen Promotoren des ECE-1 wurde zunächst die Koexpression auf Protein- (Nkx2.5) und mRNA-Ebene (Nkx2.5, ECE-1-Isoformen) in einer Kardiomyoblastenzelllinie, H9c2, nachgewiesen. Darüber hinaus wurde erstmals das isoformspezifische Expressionsmuster und die Expression von Nkx2.5 in embryonalen Rattenherzanlagen und in Herzgewebeproben von Patienten mit angeborenem Herzfehlern untersucht. In allen untersuchten Gewebeproben konnte, ebenso wie in der Kardiomyoblastenzelllinie H9c2, die Koexpression nachgewiesen werden.

Mit Luziferase-Reporter-Assays, Site-directed Mutagenese und Bandshift-Analyse konnte nachgewiesen werden, daß Nkx2.5 die alternativen Promotoren des ECE-1 differentiell reguliert. In transient transfizierten Rattenkardiomyoblasten (H9c2) werden die spezifischen ECE-1b und -1c-Promotoren durch Koexpression mit dem Transkriptionsfaktor Nkx2.5 aktiviert, während der ECE-1a-Promotor supprimiert wird. Die Wechselwirkung mit den alternativen ECE-1-Promotoren scheint dabei über unterschiedlich Mechanismen, teils direkt – für ECE-1b - und teils indirekt – für ECE-1a und -1c - vermittelt zu sein, was durch die Einführung von Mutationen in die Nkx2.5-Konsensussequenzen und durch Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion mittels Bandshift-Analyse nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse der funktionellen Promotoranalyse und der Untersuchung der endogenen isoformspezifischen ECE-Expression in H9c2-Zellen, humanem fetalem und adultem Herzen und humanen Herzgewebeprobe – mit einer schwächeren Expression der ECE-1a-Isoform – sind somit übereinstimmend. Das isoformspezifische Expressionprofil kann zumindest teilweise durch die Wirkung des endogenen Nkx2.5 auf die drei alternativen ECE-Promotoren, einer transkriptionellen Aktivierung des ECE-1b und einer transkriptionellen Repression des ECE-1a und ECE-1c erklärt werden.

Vor dem Hintergrund der in der Literatur veröffentlichten Daten über die Expression von Nkx2.5 und ECE-1 im gesunden und insuffizienten Herzen unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, daß Nkx2.5 auch in vivo ein entwicklungsbiologisch relevanter transkriptioneller Regulator der myokardialen ECE-1-Expression sein könnte. Der erstmalige Nachweis einer Interaktion zwischen dem kardialen Transkriptionsfaktor Nkx2.5 und dem ECE-1 könnte auf der Ebene der transkriptionellen Kontrolle auch eine mögliche Erklärung u.a. für das Vorliegen konotrunkaler bei Patienten mit einer Mutation im Nkx2.5-Gen und für die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz sein.

Curriculum Vitae

- 1973 27 November , in Frankfurt am Main
- 1980-1984 Grundschule, Frankfurt am Main
- 1984-1993 Lessing Gymnasium, Frankfurt am Main
Abitur, Juni 1993
- 1993/94 Studium der Germanistik, Politik und Kunstgeschichte, J.W. Goethe Universität,
Frankfurt am Main
- 1994/95 Studium der Rechtswissenschaften, Latein und Geschichte, J.W. Goethe
Universität, Frankfurt am Main
- 1995-1997 Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
- 1997 September, Physikum
- 1997-2001 Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- seit 1998 Doktorarbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der Freien Universität Berlin
(Prof. Dr. med. M. Paul), Thema: Differentielle Regulation der alternativen
Promotoren des Endothelin-Konvertierungsenzyms-1 durch den kardialen
Transkriptionsfaktor Nkx2.5
- 2001 Dezember, 3. Staatsexamen
- seit Januar Ärztin im Praktikum (AiP) am Deutschen Herzzentrum Berlin,
2002 Abteilung für Angeborene Herzfehler/Kinderkardiologie (Prof. Dr. med. P.E. Lange)