

Kurzfassung der Dissertation von Sabine Stübe

Titel: Expression und transkriptionelle Regulation von RGS16 im Modell der Kardiomyozyten neonataler Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)

In der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen molekulare Veränderungen der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion wie „Down-Regulation“ von β -Adrenorezeptoren, Entkopplung von β -adrenergen Rezeptoren, Induktion der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Untereinheit sowie von RGS-Proteinen (regulators of G protein signalling), insbesondere von RGS4 und RGS16 im Herzgewebe eine wichtige Rolle. Durch ihre GTPase-aktivierende Funktion gegenüber verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten, insbesondere gegenüber $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheiten sind RGS-Proteine in der Lage kardiale G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsprozesse zu modulieren und regulieren die Kontraktilität, das Zellwachstum von Kardiomyozyten sowie die Induktion einer Hypertrophie von Herzmuskelzellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß RGS4 und RGS16 sowohl durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) als auch durch proinflammatorische Zytokine in Herzmuskelzellen aktiviert werden.

Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation waren Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten, in denen nachgewiesen werden konnte, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die LPS-induzierten Zytokine IL-1 β und TNF α , jedoch nicht durch IL-6 und IFN γ , stimuliert wird. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob LPS direkt oder durch Induktion von TNF α und IL-1 β die RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten aktiviert. Hierzu wurden Zellkulturexperimente an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Neben der bereits bekannten Induktion der RGS16-Proteinexpression durch LPS, TNF α und IL-1 β , konnte gezeigt werden, daß die IL-1 β - oder TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten durch den jeweils entsprechenden Inhibitor, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) oder „soluble“ TNF α -Rezeptor (sTNFr), gehemmt wird. Dies deutet auf eine rezeptorvermittelte Wirkungsweise der beiden oben erwähnten Zytokine hin. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, daß Präinkubation mit IL-1ra darüber hinaus sowohl die LPS- als auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten inhibiert, während sTNFr weder die LPS- noch die IL-1 β -vermittelten stimulatorischen Effekte auf die RGS16-Proteinexpression hemmen konnte. Diese Ergebnisse implizieren, daß sowohl die LPS- als auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten durch Aktivierung von IL-1 β vermittelt wird und IL-1 β somit eine Schlüsselrolle in der Regulation der kardialen RGS16-Proteinexpression einnimmt.

Um zu klären, ob LPS die Expression und Sekretion von TNF α und IL-1 β in Kardiomyozyten aktiviert und inwieweit TNF α die IL-1 β -Expression reguliert, wurden die Proteinkonzentrationen von IL-1 β und TNF α aus Zellkulturüberständen sowie Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß LPS die IL-1 β -Expression und Sekretion sowie die TNF α -Sekretion in Kardiomyozyten stimuliert. Die LPS-induzierte TNF α -Sekretion der Kardiomyozyten lag ca. 10fach höher und erfolgte schneller (Maximum bereits nach 6 h) im Vergleich zur LPS-induzierten IL-1 β -Sekretion (Maximum nach 48 h). TNF α aktiviert sowohl die IL-1 β -Expression als auch die IL-1 β -Sekretion in Kardiomyozyten. Die durch TNF α intrazellulär induzierte IL-1 β -Proteinmenge beträgt ca. die Hälfte im Vergleich zur LPS-induzierten IL-1 β -Proteinmenge bei Berücksichtigung der maximal induzierten Proteinmengen nach 6 h. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß TNF α neben LPS einen erheblichen Anteil an der Regulation der IL-1 β -Proteinexpression und –sekretion in Kardiomyozyten hat. Eine Regulation der TNF α -Proteinexpression oder –sekretion in Kardiomyozyten durch IL-1 β konnte nicht nachgewiesen werden.

Erst kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe der RGS16-Promotor kloniert. Da bisher nur sehr wenig über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine im Herzen bekannt ist, wurde im zweiten Teil der Dissertation der RGS16-Promotor exemplarisch näher untersucht, um die für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen regulatorischen Promotorelemente und die Minimalsequenz, welche die RGS16-Promotoraktivität reguliert, zu ermitteln sowie die transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors zu analysieren. Hierzu wurden verschiedene überlappende RGS16-Promotordeletionskonstrukte, 1,4 kb-*Sac I*, 1,0 kb-*EcoR I*, 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* und 0,4 kb-*Sac I*, hergestellt, zur Untersuchung ihrer Promotoraktivität in den Luciferase-Reportervektor (pGL₃b) kloniert und anschließend transient in neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur transfiziert. Neben dem Ausgangskonstrukt 1,8 kb-*Kpn I*, dem RGS16-Promotor, zeigten drei der vier oben angeführten RGS16-Promotordeletionskonstrukte Promotoraktivität. Lediglich das Konstrukt 0,4 kb-*Sac I* zeigte keine Promotoraktivität, ist somit kein RGS16-Promotorkonstrukt. Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* zeigte als kleinstes RGS16-Promotorkonstrukt volle Promotoraktivität und wurde deshalb als Minimalsequenz des RGS16-Promotors identifiziert.

Durch Sequenzanalysen mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes konnten neben mehreren CCAAT-Boxen, insbesondere zwei für die RGS16-Promotoraktivität essentielle *cis*-Elemente, die TATA-Box und ein in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box gelegenes Sequenzmotiv, welches Homologie zur Konsensussequenz (CCT)AANATGGNC/G der Bindestelle des multifunktionalen Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Yin Yang 1 (YY1) aufweist, identifiziert werden.

Obwohl die RGS16-mRNA und Proteinexpression transient sowohl in den Herzen adulter Ratten als auch in Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten (RGS16-Proteinexpression) durch LPS sowie durch die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α induziert wird (Patten et al. 2002 und Patten et al. 2003), konnte die RGS16-Promotoraktivität weder durch LPS noch durch IL-1 β oder TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten stimuliert werden.

Auf der Suche nach weiteren den RGS16-Promotor aktivierenden Substanzen konnte gezeigt werden, daß der RGS16-Promotor wie viele Promotoren anderer Gene der transkriptionellen Regulation durch Serum unterliegt. Der EDG-Rezeptor Agonist Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) konnte als eine Serumkomponente identifiziert werden, die für die Induktion der RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten verantwortlich ist, während 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate (LPA), ein EDG-Rezeptor Agonist für eine andere EDG-Rezeptor Subfamilie, keinerlei Einfluß auf die RGS16-Promotoraktivität zeigte. Die S1-P-induzierte RGS16-Promotoraktivität konnte durch Pertussis Toxin (PTX) und den Proteinkinase C Inhibitor Chelerythrin gehemmt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine rezeptorvermittelte Gi- und Proteinkinase C-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten hin.