Universiteit Leiden
The Netherlands

Regulation of human protein S gene (PROS1) transcription

Wolf, Cornelia de

Citation
Wolf, C. de. (2006, May 29). *Regulation of human protein S gene (PROS1) transcription*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4413

Version:	Corrected Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/4413

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Het doel van het hier gepresenteerde onderzoek was om meer inzicht te verkrijgen in de wijze waarop de productie van Proteïne S (PS) geregeld wordt. PS is een eiwit in het bloedplasma dat een belangrijke rol speelt in de bloedstolling. Het is een helper (cofactor) van geactiveerd Proteïne C (APC). APC beperkt overmatige stolling door de stollingsfactoren Va en VIIIa onwerkzaam te maken. PS komt in bloed in twee vormen voor, als vrij eiwit en gebonden aan C4b-bindend eiwit (C4BP). Alleen de vrije vorm is functioneel als cofactor van APC. Een tekort aan vrij PS in het bloed draagt bij aan de ontwikkeling van diep veneuze trombose. Dit is een aandoening waarbij een bloedstolsel ontstaat in een ader (vene), waardoor de bloedbaan verstopt raakt. Dit komt het meest voor in de diepe venen van het been en staat bekend als een trombosebeen. Wanneer het stolsel of een stukje daarvan loslaat, kan het via het hart in de longen terechtkomen en een longembolie, een gehele of gedeeltelijke afsluiting van longslagaderen, veroorzaken.

Een tekort aan PS (een deficiëntie) kan aangeboren of verworven zijn. Een aangeboren deficiëntie is vrij zeldzaam en komt slechts voor in 2-8% van de families met een erfelijke tromboseneiging (trombofilie). Een verworven deficiëntie, die van voorbijgaande aard kan zijn, komt vaker voor en kan onder meer door pilgebruik (vrouwelijke geslachtshormonen), leverziekte en diffuse intravasale stolling (DIS) worden veroorzaakt. Het effect van deze factoren op PS spiegels kan direct (op het niveau van de PS productie) of indirect (door beïnvloeding van andere factoren) zijn. Het belangrijkste gereguleerde proces tijdens de eiwitproductie is doorgaans de transcriptie, waarbij een gen wordt overgeschreven in boodschapper RNA (mRNA), dat vervolgens in eiwit vertaald (getransleerd) wordt. De mRNA productie wordt geregeld door de promoter van een gen, die vlak voor de start van het gen gelegen is. De mate van transcriptie wordt bepaald door specifieke eiwitten, zogenaamde transcriptiefactoren, die aan de promoter binden en zo de transcriptie reguleren. Kennis van de transcriptionele regulatie van het gen dat codeert voor PS, *PROS1*, zal een bijdrage leveren aan ons begrip van de fluctuaties in PS spiegels in verschillende situaties.

Zorgvuldige bestudering van de DNA-volgorde in en rond de *PROS1*-promoter wees uit dat *PROS1* geen TATA-box heeft. De TATA-box is een DNA-element dat de transcriptie laat starten op een vast punt. Genen zonder TATA-box kennen vaak meerdere transcriptiestart-punten en hebben soms zelfs verschillende promoters. Het gebruik van deze promoters en/of startpunten is doorgaans celtype-specifiek. Omdat PS met name geproduceerd wordt door

levercellen, maar in mindere mate ook door andere cellen, onderzocht ik in **Hoofdstuk 2** de startplaatsen van *PROS1* transcripten in verschillende soorten cellen om zo te bepalen of de transcriptie startplaatsen van *PROS1* celtype-specifiek zijn. Het mRNA werd geïsoleerd uit levercellen (menselijke lever en de cellijnen HepG2 en HuH7), megakaryocyten (cellijn Meg01), en vaatwandcellen (humane vasculaire endotheelcellen uit navelstreng). Deze celsoorten hebben als gemeenschappelijke kenmerk dat zij in principe kunnen bijdragen aan plasma PS spiegels, omdat zij in direct contact staan met het bloed. Epitheliale cellen (cellijn HeLa) werden oorspronkelijk in de studie als een negatieve controle opgenomen, maar tijdens de studie bleek dat ook deze cellen in geringe mate PS produceren. Daarnaast werd de activiteit van *PROS1* genconstructen bepaald. In deze constructen regelt de *PROS1* promoter de transcriptie van een reporter-gen, dat codeert voor een gemakkelijk te meten eiwitproduct, in ons geval luciferase. De mate van luciferaseproductie is een maat voor de promoteractiviteit. Deze promoter-reportergenconstructen werden door middel van transfectie in de eerder genoemde cellijnen ingebracht. Indien de *PROS1* promoter gedreven wordt door celspecifieke transcriptiefactoren dan zou de relatieve sterkte van de promoterconstructen per celsoort moeten verschillen. Als *PROS1* transcriptie gereguleerd wordt door algemeen voorkomende factoren dan zou de relatieve promoteractiviteit van de verschillende constructen in alle cellijnen nagenoeg gelijk moeten zijn.

Alle celsoorten blijken eigen (endogene) *PROS1* transcripten te bevatten met een transcriptiestartplaats op 100, 117 en 147 basenparen (bp) voor de vaste startplaats van eiwitsynthese (translatie). De frequentie van gebruik van deze startplaatsen verschilde echter per celsoort. Ook bleken vaatwandcellen uit de navelstreng een extra startplaats van het *PROS1* transcript te vertonen op 200 bp voor de translationele start. Deze resultaten tonen aan dat de exacte verdeling van startpunten van *PROS1* transcripten in de bestudeerde celsoorten varieert. Deze vorm van celsoortspecifieke regulatie van transcriptie wordt mogelijkerwijs veroorzaakt door verschillen in de samenstelling van de groep eiwitten in de celkern die gezamenlijk de transcriptie reguleren. Voor alternatieve *PROS1* promoters werd geen bewijs gevonden en ook een eerder geopperde mogelijkheid dat *PROS1* transcriptie vanuit het eerste intron geïnitieerd zou kunnen worden, werd uitgesloten.

Een *PROS1* promoter met maximale activiteit werd geïdentificeerd door middel van *in vitro* studies met *PROS1* promoter-reportergenconstructen. De maximaal actieve promoter werd voor alle celsoorten vastgesteld op een lengte van 370 bp stroomopwaarts van de translationele start, zoals aanwezig in het *PROS1* promoterconstruct PS370. Er worden slechts

kleine verschillen gevonden in het expressiepatroon van de promoterconstructen in de geselecteerde celsoorten. Terwijl de activiteit van de constructen in HepG2, HeLa en HUVEC cellen met toenemende lengte van het *PROS1* promoterfragment sterk afnam, behielden de langere *PROS1* promoterconstructen in de cellijnen Meg01 en HuH7 een relatief hoge activiteit.

Tegen de verwachting in behield het maximaal actieve promoterfragment in HepG2 cellen 40% van zijn activiteit nadat alle gebruikelijke transcriptie startpunten vanaf de 3' kant waren verwijderd. Toen vervolgens de transcriptie startplaatsen bepaald werden op het PS370 construct bleek dat deze verschilden van de startpunten gevonden voor de transcriptie van het endogene *PROS1,* zoals dat op de chromosomen van de HepG2 cellen aanwezig was. Hieruit werd geconcludeerd dat transcriptie vanaf de getransfecteerde promoterconstructen vanuit veel meer punten werd geïnitieerd. Vermoedelijk wordt dit veroorzaakt door de minder nauwkeurige regulatie van transcriptie initiatie in het modelsysteem in vergelijking met het volledige gen in zijn normale chromosomale omgeving.

De bevindingen in **Hoofdstuk 2** wijzen uit dat de basale activiteit van de *PROS1* promoter in alle celsoorten min of meer op een zelfde wijze is gereguleerd. De kleine verschillen in transcriptie startplaatsen van het endogene *PROS1* en het expressiepatroon van de verschillende promoterconstructen in de verschillende cellijnen wijzen wel op een mogelijke celspecifieke regulatie van transcriptie via de startlocatie, maar spreken een grote invloed daarvan op de basale activiteit tegen.

Hoofdstuk 3 bevat een verkennende studie naar de induceerbaarheid van de in **Hoofdstuk 2** gevonden maximaal actieve promoter PS370 door verschillende zorgvuldig geselecteerde transcriptiefactoren. Cotransfectie van HeLa cellen met het PS370 construct en expressievectoren met daarin een gen coderend voor een transcriptiefactor, wees uit dat *PROS1* promoteractiviteit respectievelijk 24- en 15-maal gestimuleerd werd door de alom aanwezige transcriptiefactoren Sp1 en Sp3. Ook de leverspecifieke transcriptiefactoren C/EBPβ en FOXA2 en in geringere mate HNF6 en DBP hadden een positieve invloed op de PS370 activiteit. Nauwkeurige bestudering van de *PROS1* DNA-volgorde (sequentie) in PS370 en de conservering daarvan tussen verwante diersoorten, resulteerde in de lokalisatie van evolutionair goed bewaard gebleven consensus bindingsplaatsen voor onder andere C/EBPβ, STAT, FOXA2 en transcriptiefactoren van de Sp-familie.

De resultaten van de verkennende studie werden bevestigd in **Hoofdstuk 4**, waarin door middel van de bestudering van eiwit-DNA interacties aangetoond werd dat FOXA2, Sp1 en Sp3 inderdaad op de gevonden locaties binden aan de *PROS1* promotersequentie. Vier Sp1 bindingsplaatsen werden gevonden die op 177-146 bp, 253-230 bp, 298-275 bp en 359-335 bp stroomopwaarts van de translationele start werden gelokaliseerd. De aanwezigheid van een FOXA2 bindingsplaats werd al eerder door een andere groep aangetoond op 282-258 bp stroomopwaarts van de translationele start en kon worden bevestigd. Tevens werd een interactie van de transcriptiefactoren NFY (op 382-359) en CREB/ATF (op 346-323) met de promoter waargenomen. Analyse van de functionaliteit van de gevonden transcriptiefactorbindingsplaatsen middels mutagenese wees uit dat Sp1 bindingsplaatsen 177-146 en 253-230 van groot belang zijn voor de basale activiteit van het PS370 construct in HepG2 cellen. In constructen waarin deze bindingsplaatsen gemuteerd waren was de basale PS370 activiteit gereduceerd tot respectievelijk 70 en 50% van die van het onveranderde construct. Mutatie van uitsluitend de bindingsplaatsen op 298-275 en 359-335 had geen negatief effect, maar een mutant waarin alle vier de Sp1-posities werden gemuteerd had een restactiviteit van slechts 20%.

Cotransfectie van HepG2 cellen met een Sp1 expressievector en de viervoudige PS370-Sp1 mutant liet echter zien dat deze mutant ondanks de afgenomen basale activiteit nog door Sp1 geïnduceerd kan worden, hetgeen er op duidt dat niet alle functionele Sp1 bindingsplaatsen in het PS370 construct werden geïdentificeerd. Hoogstwaarschijnlijk is een extra niet-gemuteerde Sp1 bindingsplaats aanwezig in de sequentie 177-146. De *in vitro* aangetoonde interactie tussen Sp1 en de *PROS1* promoter werd tenslotte bevestigd door een chromatine immunoprecipitatie (ChIP) met een antilichaam specifiek voor Sp1.

Mutaties in de bindingsplaatsen voor de transcriptiefactoren FOXA2, CREB/ATF en NFY hadden niet of nauwelijks een negatief effect op de basale expressie van het luciferase reporter-gen onder de controle van de *PROS1* promoter. Cotransfectie van HepG2 cellen met de PS370 FOXA2 mutant en een FOXA2 expressievector resulteerde weliswaar in een afgenomen respons van de mutant ten opzichte van het normale construct, maar de interpretatie van de data werd bemoeilijkt door het feit dat de controle vector zonder *PROS1* promoter ook sterk op FOXA2 reageerde.

De resultaten in **Hoofdstuk 4** bevestigen die van **Hoofdstuk 2**. De basale *PROS1* transcriptie wordt inderdaad gereguleerd door een alomtegenwoordige transcriptiefactor, namelijk Sp1. De transcriptiefactoren verantwoordelijk voor de hoge leverspecifieke expressie

van PS werden echter vooralsnog niet geïdentificeerd. Het is goed mogelijk dat een deel van deze weefselspecifieke expressie wordt veroorzaakt door zogenaamde epigenetische modulering van de *PROS1* promoter middels promotermethylering en histonmodificatie. Ondanks pogingen om promotermethylering aan te tonen is het vooralsnog niet gelukt hieromtrent een eenduidig resultaat te verkrijgen.

Een andere interactie die naar voren kwam uit de studie in **Hoofdstuk 3** was die tussen PS370 en C/EBPβ. C/EBPβ staat bekend als de transcriptiefactor die de signalering van de ontstekingsmediator interleukine 6 (IL6) bewerkstelligt. STAT3 is de tweede nucleaire factor die IL6-effecten medieert. In reactie op binding van IL6 aan de zijn receptor op de celmembraan worden zowel STAT3 als C/EBPβ gefosforyleerd, waarna ze de kern ingaan en verschillende genen aanzetten tot (versterkte) transcriptie door aan hun promoters te binden. Voor STAT3 is deze fosforylering de enige manier van activatie, terwijl de transcriptie van het C/EBPβ-gen zelf ook door IL6 wordt opgereguleerd. In **Hoofdstuk 5** onderzochten wij het effect van IL6 op PS spiegels geproduceerd door gekweekte HepG2 cellen. Wij bevestigden de resultaten van andere onderzoekers, die eerder hadden gevonden dat PS spiegels in celkweek inderdaad toenemen tijdens stimulatie met IL6. Vervolgens toonden we aan dat dit effect ook zichtbaar is op het niveau van het *PROS1* mRNA en dus hoogstwaarschijnlijk wordt veroorzaakt door een direct effect op promoteractiviteit. In onze experimenten nam de concentratie van gefosforyleerd STAT3 (p-STAT3) toe in de kern van HepG2 cellen na incubatie met IL6, terwijl die van C/EBPβ gelijk bleef. Dit duidde erop dat de waargenomen effecten waarschijnlijk gemedieerd werden door STAT3.

De DNA-volgorde in het PS370 construct waardoor de IL6-respons gemedieerd zou kunnen worden, bevat een consensus bindingsplaats voor zowel C/EBPβ als voor STAT3 op 229-207 bp stroomopwaarts van de start van translatie. Nadat deze bindingsplaats in verscheidene *PROS1* promoterconstructen gemuteerd was, waardoor zowel de C/EBPβ als de STAT3 bindingplaatsen verdwenen waren, reageerde de promoter niet meer op de toevoeging van IL6. Eiwit-DNA bindingsassays toonden aan dat STAT3 inderdaad kan binden aan de normale sequentie, maar niet aan die van de mutant, en dat deze interactie versterkt wordt door stimulatie van de cellen met IL6. Voor C/EBPβ werd een dergelijke interactie echter niet waargenomen. De C/EBPβ consensussequentie was bovendien niet in staat binding van het eiwit aan de *PROS1* promoter sequentie te voorkomen, terwijl de STAT3 consensussequentie dat wel kon. Bovendien verschoof slechts een deel van het eiwit-DNA complex in de gel na

toevoeging van een C/EBPβ antilichaam, terwijl incubatie met een tegen STAT3 gericht antilichaam resulteerde in een nagenoeg complete verschuiving van het eiwit-DNA complex. Hierdoor is duidelijk geworden dat STAT3 een belangrijke rol speelt bij de reactie van de *PROS1*-promoter op IL6. Een rol van C/EBPβ kan echter niet volledig worden uitgesloten op basis van de resultaten in **Hoofdstuk 3**.

Tijdens ontsteking zijn de totale PS spiegels in het plasma van patiënten nagenoeg onveranderd tot licht verhoogd, terwijl vrije PS spiegels soms gereduceerd zijn of ook gelijk blijven. Een potentiële geringe inductie van plasma PS spiegels door IL6, zoals verwacht mag worden op basis van onze experimenten, wordt hoogstwaarschijnlijk tenietgedaan door de gelijktijdige stijging van de spiegel van C4BP, dat ook geïnduceerd wordt door IL6. Het belang van de inductie van PS door IL6 moet dan wellicht ook niet gezocht worden in een effect op de plasma PS spiegels, maar meer op lokaal (weefsel)niveau.

PS wordt aangemaakt als een prepro-eiwit, waarvan het pre- en propeptide verwijderd worden tijdens de verdere rijping van het eiwit in de cel. **Hoofdstuk 6** beschrijft de ontdekking van een alternatief *PROS1* transcript dat codeert voor 32 extra aminozuren tussen het pre- en propeptide van het onvolwassen eiwit. Dit transcript werd gevonden tijdens de optimalisatie van een kwantitatieve PCR voor het normale *PROS1* mRNA. Het nieuwe transcript was aanwezig in alle celsoorten die getest werden, waaronder een sample van een humane lever. Het alternatieve transcript werd gekloneerd en de expressie en grootte van het resulterende alternatieve PS (PSalt) werd vergeleken met die van het standaard PS na transfectie van beide constructen in COS-1 cellen. Het alternatieve eiwit hoopte zich op in de cel, terwijl het standaard PS product, zoals verwacht, werd uitgescheiden. Western blot analyse gaf aan dat het alternatieve eiwit dat in de cel aanwezig bleef mogelijk groter was dan het standaard product. Dit suggereerde dat de extra aminozuren tussen het pre- en propeptide de afscheiding van deze twee peptides in het rijpingsproces van PSalt verstoorde. Niet alleen bleef het alternatieve PS in de cel, het vormde ook aggregaten die zichtbaar waren op een Western blot.

De implicaties van deze bevindingen zijn vooralsnog onduidelijk, aangezien aggregaten met het alternatieve PS eiwit niet in lysaten van HepG2 cellen werden gevonden, die het alternatieve transcript ook produceren. Mogelijkerwijs wordt het alternatieve *PROS1* transcript afgebroken voordat het omgezet wordt tot eiwit. In dat geval bestaat de mogelijkheid dat vorming van het alternatieve transcript *in vivo* gebruikt wordt om de synthese van het

standaard PS te reguleren. Een andere en misschien meer waarschijnlijke mogelijkheid is dat PSalt efficiënter wordt verwerkt wanneer het in relatief lage hoeveelheden worden geproduceerd in de aanwezigheid van standaard PS en/of in cellen die gewend zijn PS te produceren, zoals HepG2 cellen.

De regulatie van *PROS1* transcriptie stond centraal in het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven is. Dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in die transcriptie en draagt daardoor bij aan de basiskennis die noodzakelijk is voor het begrijpen van de regulering en de schommelingen in de PS spiegels van patiënten.