

Jürgen Prestel

Dr. med.

Charakterisierung des LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktors 1 Beta (LMX1B) in induzierbaren Zelllinien

Geboren am 13.08.1973 in Bühl

Reifeprüfung am 18.05.1993 in Bühl

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis WS 2000/2001

Physikum am 20.03.1997 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und London

Staatsexamen am 20.06.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Witzgall

Der Transkriptionsfaktor LMX1B (LIM-Homöobox 1 Beta) gehört zur Familie der LIM-Homöodomän-Proteine. Mutationen im *LMX1B*-Gen sind Ursache des Nagel-Patella-Syndroms, einer seltenen autosomal-dominant vererbten Erkrankung. Die bisher bekannten Mutationen liegen hauptsächlich im Bereich der beiden LIM-Domänen, die Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln, und im Bereich der Homöodomäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Untersuchungen an Tiermodellen haben gezeigt, dass LMX1B u.a. eine wichtige Rolle für die Entwicklung dorsal gelegener Strukturen der Gliedmaßen und für die Differenzierung und Funktion von Podozyten in der Niere spielt. Dementsprechend zählen zu den typischen Symptomen des Nagel-Patella-Syndroms fehlgebildete Fingernägel und missgebildete oder fehlende Kniescheiben sowie in 30 bis 50% der Fälle eine Nephropathie.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Informationen darüber zu gewinnen, auf welche Art und Weise LMX1B seine Rolle in der Zelle ausübt. Hierzu wurden zunächst DNA-Konstrukte hergestellt, die für verschiedene LMX1B-Mutanten kodieren, denen entweder die LIM1-, die LIM2-Domäne oder beide LIM-Domänen fehlen oder die mehrere LIM1- bzw. LIM2-Domänen besitzen. Dann wurden stabil transfizierte, induzierbare HeLa-Zellen entwickelt, die diese LMX1B-Mutanten regulierbar unter Anwendung des tet-off-Systems synthetisierten. Sowohl das Wildtyp-LMX1B-Protein als auch die (LIM1+2)-Deletionsmutante, der beide

LIM-Domänen fehlen, wurden in den stabilen Zelllinien näher analysiert. Die Immunzytochemie ergab, dass sowohl LMX1B als auch die (LIM1+2)-Deletionsmutante im Zellkern lokalisiert sind. Mittels Laktatdehydrogenase-Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass LMX1B eine stark wachstumshemmende Wirkung auf HeLa-Zellen ausübt und dass die beiden LIM-Domänen für diesen Effekt notwendig sind, da die (LIM1+2)-Deletionsmutante das Wachstum nur schwach beeinflusst. Des Weiteren führt LMX1B bei HeLa-Zellen zur Ausbildung von großflächigen Zellfortsätzen, so genannter Lamellipodien.

Zur weiteren Aufklärung der durch LMX1B verursachten Wachstumsinhibition wurden die induzierbaren HeLa-Zellen hinsichtlich ihres Zellzyklusverhaltens analysiert und auf Apoptose untersucht. Mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse wurde der Nachweis erbracht, dass LMX1B das Zellzyklusverhalten beeinflusst und zu einer signifikanten Verschiebung des Zellzyklus hin zur G_0/G_1 -Phase führt. Demgegenüber wiesen die Daten eines Zusatzexperiments darauf hin, dass die (LIM1+2)-Deletionsmutante keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung hat. In diesem Zusammenhang ergab eine Genexpressionsanalyse, die in Kooperation mit dem DKFZ in Heidelberg durchgeführt wurde, dass LMX1B unter anderem die Expression von Genen beeinflusst, deren Produkte eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellzyklus und Zellwachstum spielen. So war in den induzierten, LMX1B produzierenden Zellen die mRNA-Synthese des Cdk-Inhibitors 1A (p21/Cip1) hochreguliert, während die mRNA-Synthese von Cyclin B1 und Nucleophosmin vermindert war. Zur Untersuchung auf Apoptose wurden FACS-Analyse, Hoechst-Färbung und der Nachweis internukleosomaler DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (DNA-Leiter) eingesetzt. Die durchgeführten Experimente wiesen darauf hin, dass Apoptose keine wesentliche Rolle in Bezug auf die wachstumshemmende Wirkung von LMX1B spielt.

Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antikörper gegen LMX1B und das Protein MBIP entwickelt, indem Kaninchen mit dem jeweiligen bakteriell hergestellten Protein mehrfach immunisiert wurden. MBIP („MAPK upstream kinase - Binding Inhibitory Protein“) ist in Signaltransduktionswege involviert und war in einer anderen Arbeit als möglicher Interaktionspartner von LMX1B identifiziert worden. Mittels der hergestellten Antikörper konnte immunzytochemisch eine nukleäre Lokalisation beider Proteine nachgewiesen werden. Beide Antikörper waren auch im Western Blot und bei der Immunpräzipitation einsetzbar und stellen nützliche Werkzeuge für zukünftige Arbeiten dar.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse hinsichtlich Wachstumsinhibition, Beeinflussung von Zellzyklus und Genexpression sowie Ausbildung von Lamellipodien haben zum einen

neue Einblicke in die Funktion und Wirkung von LMX1B gegeben und zum anderen ein weites Feld für zukünftige Untersuchungen eröffnet. Künftige Arbeiten werden sich mit der Frage zu befassen haben, über welche Mechanismen die Wachstumshemmung und der Eingriff in den Zellzyklus erfolgt und ob diese Wirkung von LMX1B direkt über die veränderte Expression der für p21, Cyclin B1 oder Nucleophosmin kodierenden Gene oder auf andere Weise vermittelt wird. Weiterhin ist wichtig, zu untersuchen, ob LMX1B auch Zellzyklus und Wachstum von Zellen, die LMX1B normalerweise im Organismus produzieren, wie z.B. die Podozyten, negativ reguliert und welche Bedeutung diese bei HeLa-Zellen gezeigte Wirkung im sich entwickelnden oder adulten Organismus haben könnte. So könnte man z.B. vermuten, dass die Beeinflussung des Zellzyklus durch LMX1B eine physiologische Rolle im Hinblick auf Wachstumsstillstand und Differenzierung während der Podozytenentwicklung spielt. Im Zusammenhang mit der Bildung von Lamellipodien wäre zu untersuchen, ob und auf welche Weise LMX1B die Umorganisation des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Sollte sich eine Interaktion von LMX1B und MBIP bestätigen, müsste der Frage nachgegangen werden, inwiefern LMX1B dadurch mit Signaltransduktionskaskaden in Verbindung steht.