

Marcus Brecht
Dr. med.

Aktivierung von *gef-h1*, einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor für RhoA, durch DNA-Transfektion

Geboren: 09.09.1975 in Bruchsal

Reifeprüfung am 22.06.1995 in Bruchsal

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS1996/1997 bis WS2003/2004

Physikum am 07.09.1998 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Schwäbisch-Hall, Birmingham und Liverpool

Staatsexamen am 25.05.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Prof. Dr. med. C.R. Bartram

Die Entstehung von Tumoren ist eng mit der Akkumulation von genetischen sowie epigenetischen Alterationen vergesellschaftet. DNA-Transfektionsassays ermöglichen die Identifikation von Onkogenen und tragen somit zum Verständnis der Entstehung einer transformierten Zelle bei.

Nach Einbringen von DNA der histiozytären Zelllinie U937 und Induktion von Tumoren in Nacktmäusen wurde in der vorliegenden Arbeit ausgehend von einer genomischen Cosmidbibliothek aus der DNA einer Drittzyklustransfektanten durch Hybridisierung mit einer *Alu*-Sonde eine Gruppe von Cosmiden isoliert, welche ein potentiell transformierendes humanes Gen enthalten sollten. Zur Charakterisierung dieses möglichen Onkogens wurde unter Berücksichtigung der verfügbaren Informationen in den Datenbanken eine neuartige Methode zur Sequenzierung längerstreckiger DNA-Abschnitte angewendet, die auf dem Prinzip der Insertion des Transposons *Tn5* als Primerbindungsstelle basiert.

Nach Optimierung dieser Methode konnte in einem ersten Schritt die Gesamtsequenz von 2 *Alu*-positiven Cosmiden unter Kombination mit PCR-basierten Techniken erschlossen werden. Beide Cosmide umfassen etwa 33 kb genomischer Sequenz aus der Drittzyklustransfektante. Durch Datenbanksuche und Verwendung geeigneter computergestützter Algorithmen konnten die auf den Cosmiden enthaltenen humanen Sequenzanteile 3 chromosomalen Abschnitten zugeordnet werden. Hiervon sind die Abschnitte auf 1q22 sowie 2q37 bereits bekannten Genen zuzuordnen, der dritte Abschnitt stammt von Chromosom 13q12.13 und umfasst eine CpG-Insel.

Bei den identifizierten Kandidatengenen handelt es sich um *hpask* und um *gef-h1*. *hpask* ist eine humane PAS-Domänen enthaltende Kinase; *gef-h1* ein der Familie der *dbl*-verwandten

Gene zuzuordnender Austauschfaktor für RHOA, ein Mitglied der Gruppe der kleinen G-Proteine (RHO-GTPase).

Sodann wurde versucht, das fehlende Fragment zwischen beiden getragenden Cosmiden auf genomischer Ebene zu erschließen. Hierfür wurde eine Phagenbibliothek aus der genomischen DNA der Drittzyklustransfektanten konstruiert und durch Endsequenzierung, Restriktionsverdau und PCR-basiertes Vorgehen die Überlappung hergestellt. Die Analyse der enthaltenen getragenden Abschnitte ergab, dass von *hpask* die Exons 4-9 in der Transfektante vorhanden waren, jedoch in der Northern-Blot-Analyse nicht detektiert wurden, was eine Expression und Funktion als transformierendes Gen von *hpask* im vorliegenden Tumor ausschloß. Hingegen konnte durch die Untersuchung mittels einer cDNA-Sonde aus dem 3'-nichttranslatierten Bereich von *gef-h1* ein Transkript sowohl in der Drittzyklustransfektante als auch in der Kontrollzelllinie detektiert werden. Hierbei fiel ein Rearrangement des Transkripts in der transfizierten Zelllinie im Vergleich zur nichttransfizierten Kontrollzelllinie auf, was die durch Sequenzdaten erschlossene genomische Konstellation exakt widerspiegelte.

Die während des Transfektionsprozesses eingetretene Deletion von *gef-h1*-Sequenzen liegt innerhalb von Exon 6 und führt zu einem Verlust des N-terminalen Proteinanteils, der für eine sogenannte Zinkfingerdomäne (auch C1-Region genannt) kodiert. Restriktionsanalysen konnten belegen, daß die Deletion des 5'-Endes von *gef-h1* im Rahmen des DNA-Transfers eingetreten ist und nicht bereits in der zur Transfektion verwendeten DNA aus der U937-Zelllinie vorlag.

In einem nächsten Experiment konnte durch 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) eine Fusion des detektierten Transkriptes mit dem putativen CpG-Bereich von Chromosom 13q13.12 nachgewiesen werden.

Wie zeitgleich veröffentlichte Befunde zeigten, bindet ein GEF-H1-Protein mit einer N-terminalen Deletion der Zinkfingerdomäne nicht mehr an Mikrotubuli, wobei hierdurch Veränderungen im Aktinzytoskelett herbeigeführt werden und die katalytische Austauschaktivität gegenüber der zugeordneten GTPase RHOA erhöht wird.

Eine von mir durchgeführte Zytoskelettfärbung konnte keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen der stabil mit U937-DNA transfizierten Zelllinie und nichttransfizierten NIH/3T3-Zellen zeigen, so daß weitere Mechanismen, wie beispielsweise Effekte auf transkriptioneller Ebene, zum invasiven Wachstumsverhalten beitragen könnten.

Gef-h1 konnte erstmals im Tumorigenizitätsassay als tumorinduzierend nachgewiesen werden. Als Aktivierungsmechanismus liegt eine N-terminale Deletion vor, die einen bekannten Aktivierungsmodus für Gene aus der Familie der *dbf*-verwandten GEFs darstellt. Wie aber aus den Ergebnissen anderer Gruppen zu entnehmen ist, kann auch eine inaktivierende Punktmutation in der Zinkfingerdomäne ähnlich wie eine Deletion zu einem

Verlust der Mikrotubulusbindung führen. Somit wäre ähnlich wie bei der kürzlich durchgeführten Mutationsanalyse codierender Abschnitte von *b-raf* die Sequenzanalyse einer größeren Gruppe von Tumorzelllinien und Primärtumoren eine denkbare Strategie, um die potentielle Bedeutung von *gef-h1* auch im Hinblick auf die Tumorentstehung beim Menschen zu klären.