

Jessica Spitzer
Dr. med.

Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors SHOX2

Geboren am 07.02.1981 in Nürnberg
Staatsexamen am 06.11.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. G. Rappold

Homöoboxgene sind an der Ontogenese aller höheren Organismen beteiligt und Fehlfunktionen dieser Gene wurden bereits im Zusammenhang mit zahlreichen menschlichen Krankheiten beschrieben, so z.B. *PAX3* beim Waardenburg-Syndrom, *HOXD13* bei der Synpolydaktylie und *SHOX* („short stature homeobox-containing gene“), das ursächlich für den Kleinwuchs bei Patientinnen mit Turner-Syndrom ist. Für *SHOX2*, dem mit *SHOX* am nächsten verwandten Gen, ist bislang noch nicht bekannt, zu welchen menschlichen Phänotypen ein Ausfall seiner Funktion führt. Die Untersuchung eines durch klassisches „gene targeting“ hergestellten *Shox2*^{-/-}-Knockout-Mausmodells ergab jedoch, dass der homozygote Verlust des *Shox2*-Gens zu schweren Herzfehlern und embryonaler Letalität in der Maus führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die *SHOX2*-Expression mittels RT-PCR im Herzen bestätigt und dabei gleichzeitig ein neues Expressionsprofil an zahlreichen menschlichen und murinen Geweben erstellt. Die dabei gezeigte ubiquitäre Expression lässt erwarten, dass *SHOX2* zahlreiche wichtige Aufgaben übernimmt. Da die Modulation gewebsspezifischer Funktionen zumeist durch Proteininteraktionen erreicht wird, stellt die Identifizierung *SHOX2*-interagierender Proteine ein vordringliches Ziel dar. Zur Identifizierung solcher Interaktionspartner wurde ein „Yeast Two-Hybrid Screen“ durchgeführt, um mit *SHOX2* interagierende Proteine zu identifizieren und so einen Einblick in seine Regulation zu gewinnen.

Da die Identifizierung von falsch-positiven Interaktionen ein für „Yeast Two-Hybrid Screens“ typisches Phänomen darstellt, wurden die aus dem primären Screen erhaltenen Hefeklonen verschiedenen Validierungen unterzogen. Bei den vier (z.T. mehrfach isolierten) Proteinen, deren Interaktion mit *SHOX2* bestätigt werden konnte und für die eine Untersuchung der physiologischen Relevanz der Interaktion lohnend erscheint, handelt es sich um:

- DKFZp434N1923: ein Protein, dessen Funktion noch weitgehend unbekannt ist
- FBLN4: eines von sechs Mitgliedern der Fibulin-Familie, dem ein onkogenes Potential zugeschrieben wird
- PSMA3: eines von 64 Proteinen des Proteasoms
- FHL2: eines von fünf Mitgliedern der FHL-Familie, das als LIM-Domänen-Protein u.a. mit so unterschiedlichen Aufgaben wie Transkriptionsmodulation, Zelladhäsion und -motilität sowie einer Rolle in der Herzphysiologie in Verbindung gebracht wird

FHL2 ging als der interessanteste putative Interaktionspartner von *SHOX2* aus dem „Yeast Two-Hybrid Screen“ hervor. Zum einen ist es ebenfalls hauptsächlich im Zellkern lokalisiert und zum anderen wird es auch stark im Herzen exprimiert. Deshalb wurden mit FHL2 weitere, über die für die anderen Bindungspartner hinausgehende, Experimente durchgeführt.

Die Spezifität der SHOX2-FHL2-Interaktion konnte dadurch unterstrichen werden, dass SHOX2 (außer mit FHL2) nur mit FHL3, nicht jedoch mit dem ebenfalls nahe verwandten FHL1 interagiert. Darüber hinaus gelang es, die SHOX2-FHL2-Interaktion nicht nur *in vitro* durch GST-Pulldown-Experimente zu bestätigen, sondern ebenfalls *in vivo* durch Co-Immunopräzipitationen, die als stringenteste Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen gelten.

Da für FHL2 bereits mehrfach im Zusammenhang mit anderen Proteinen eine Rolle in der Ausbildung höhermolekularer (transkriptionsregulierender) Komplexe beschrieben wurde, wird es interessant sein zu untersuchen, ob SHOX2 auch Teil solcher Komplexe ist, da es durchaus denkbar ist, dass der für *Shox2*^{-/-}-Tiere beschriebene Herzphänotyp durch eine über Fhl2 vermittelte (dann fehlende) Interaktion mit einem dritten, bisher noch nicht identifizierten Protein zustande kommt.

Es wird von großem Interesse sein zu untersuchen, ob solche höhermolekularen Komplexe bestehend aus FHL2, SHOX2 und weiteren Proteinen nachweisbar sind und natürlich auch, diese bislang noch unbekannt Proteine zu identifizieren, um besser zu verstehen, in welche Signalkaskaden SHOX2 eingebunden ist. Darüber hinaus wird der Frage nachgegangen werden, inwieweit z.B. FHL3 (wie bereits für andere Interaktionen beschrieben) in der Lage ist, Funktionen von FHL2 zu übernehmen und so dessen Ausfall zu kompensieren. In diesem Zusammenhang wäre die Analyse eines (bislang noch nicht vorhandenen) *Fhl2-Fhl3-Shox2*-Knockouts von besonderer Relevanz.