



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

GrinchGEF – ein neuer Guaninnukleotid-Austauschfaktor für die monomere GTPase Rho

Autor: Stefan Winkler
Institut / Klinik: Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Doktorvater: Prof. Dr. T. Wieland

Rho-GTPasen stehen als molekulare Schalter im Mittelpunkt zahlreicher Signaltransduktionswege und regulieren unterschiedlichste zelluläre Prozesse. Dazu gehört neben der Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts auch die Regulation der Zell-Proliferation, der Zell-Differenzierung und der Genexpression. Die Aktivierung der Rho-GTPasen erfolgt durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), die die intrinsische GDP/GTP-Austausch-Aktivität der Rho-GTPasen stimulieren und damit zu einer vermehrten Bildung von aktiven GTP-gebundenen Rho-GTPasen führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor mit Homologie zu der „Dbl-Homologie-Domäne“ von p164-RhoGEF kloniert und funktionell charakterisiert. Dieses Rho-GEF war zuvor durch computergestützte Untersuchungen von Protein-Datenbanken identifiziert worden. Für die funktionelle Charakterisierung wurde zunächst das cDNA-Konstrukt kloniert. Die cDNA kodiert für ein 1235 Aminosäuren langes Protein, das GrinchGEF genannt wurde. Computergestützte Vergleiche mit dem entsprechenden genomischen Sequenzabschnitt ergaben, dass GrinchGEF eine Spleiß-Variante des ARHGEF10L genannten Gens darstellt. Die Untersuchung des Expressionsmusters von GrinchGEF mittels Northern-Blot-Analysen aus humanen Geweben ergab drei Transkripte dieses Gens von ca. 4kb, 5kb und 6kb Länge. Die stärkste Expression konnte dabei im Skelettmuskel und Pankreas nachgewiesen werden. In Immunfluoreszenz- und Zellfraktionierungs-Experimenten konnte gezeigt werden, dass GrinchGEF ein cytosolisches Protein ist. Die durch die computergestützte Sequenzanalyse vorhergesagten Transmembran-Segmente konnten deshalb experimentell nicht bestätigt werden. GrinchGEF stimulierte *in vitro* den GDP/GTP-Austausch an RhoA, nicht jedoch an Rac1 oder Cdc42 und aktivierte in intakten Zellen gleichermassen RhoA, RhoB und RhoC. Weiterhin induzierte GrinchGEF am Aktin-Cytoskelett die Bildung von Rho-spezifischen Aktin-Stressfasern. In Versuchen zu der übergeordneten Regulation der Aktivität von GrinchGEF konnte gezeigt werden, dass GrinchGEF durch eine cGK/cGMP-vermittelte Phosphorylierung in seiner Aktivität stimuliert wird.

GrinchGEF lässt sich einer neuen Rho-spezifischen Sub-Familie der Dbl-Proteine zuordnen, die aus GrinchGEF, p164-RhoGEF und dem bislang funktionell nicht charakterisiertem GEF10 besteht. Alle Proteine teilen eine ähnliche Domänenstruktur aus N-terminaler DH-Domäne, eventuell einer untypischen PH-Domäne ohne Homologie zu bekannten PH-Domänen sowie einer C-terminalen WD40-like Domäne mit β -Propeller-Struktur; sie weisen jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster auf.