

Katharina Täubert
Dr. med.

Funktionelle Charakterisierung von *CIC*-Mutationsvarianten

Fach/Einrichtung: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Andreas von Deimling

Das *CIC*-Gen auf Chromosom 19q13.2 spielt durch seine Einbindung in RTK-Pathways eine Rolle in der Transkriptionsregulation. Mutationen dieses Gens, die besonders in der DNA-bindenden Domäne (Exon 5) und der Protein-Interaktionsdomäne (Exon 20) auftreten, sind vor allem in oligodendroglialen Tumoren nachgewiesen. Meist sind sie mit einem LOH 1p/19q und einer Mutation der *IDH1* oder 2 vergesellschaftet. Neben dem Vorkommen in oligodendroglialen Tumoren treten Veränderungen von *CIC* auch in einer Reihe weiterer Tumore auf, so z.B. dem Astrozytom und dem Mammakarzinom. Im Medulloblastom ist eine Überexpression von *CIC* und in einer Unterart der Ewing-Sarkome eine Fusion mit *DUX4* durch eine Translokation t(4;19)(q35;q13) nachgewiesen worden. Darüber hinaus bildet *CIC* Komplexe mit Ataxin-1 und könnte durch diese Interaktion eine Rolle bei der Entstehung und/oder Progression der Spinozerebellären Ataxie Typ 1 sowie einer Reihe von Lungenerkrankungen spielen.

Trotz seiner möglichen Beteiligung an der Entstehung mannigfaltiger Erkrankungen ist weder die Funktion von Wild Typ-*CIC*, noch die Auswirkung einer Mutation von *CIC* beim Menschen abschließend geklärt. Um die Auswirkungen von Wild Typ- und mutiertem *CIC* auf Zellen untersuchen zu können, wurden Zelllinien verschiedener Gewebe mittels PCR auf die Expression von *CIC* und seinen Zielgenen hin gescreent. Aus diesen Zelllinien wurden HEK293T-Zellen ausgewählt, in denen FlagN-getaggte Vektoren mit Volllänge-*CIC* und den häufigsten Mutationsvarianten des Gens exprimiert wurden. Über Western Blot-Analyse wurde die Expression dieser Vektoren und die Expression von endogenem *CIC* nachgewiesen. Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen der exprimierten Form von *CIC* und der Transkription der *CIC*-Zielgene *ADPRHL*, *CCL2*, *ETV1*, *ETV5* und *RaLP* wurden Agarosegelelektrophorese und Real Time-PCR benutzt. Mit Hilfe des Cell Titer Glo-Systems wurde die Proliferationsrate der Zellen mit eingebrachten Vektoren im Vergleich zu einer Wild Typ-HEK293T-Kontrollzelllinie untersucht.

Die vergleichenden Untersuchungen verschiedener Zelllinien mittels PCR haben gezeigt, dass *CIC* und seine Zielgene in einer Reihe von Geweben exprimiert werden. Mittels Western Blot konnte in den für die Versuche ausgewählten HEK293T-Zellen ausschließlich die Expression der long isoform von *CIC* nachgewiesen werden. Die Banden der FlagN-getagkten Volllänge-Varianten (Wild Typ-*CIC* und Punktmutationen) waren von der Bande für endogenes *CIC* nicht klar abgrenzbar. Für zwei der C-terminal trunkierten, FlagN-getagkten Mutationsvarianten konnte eine spezifische Bande nachgewiesen werden. Eine Auswirkung von Wild Typ-*CIC* oder seinen Mutationsvarianten auf die Transkriptionsrate von *CIC*-Zielgenen konnte nicht beobachtet werden. Eine denkbare Erklärung im Falle der eingebrachten Mutationen ist, dass diese, wie verschiedentlich vermutet, tatsächlich zu einem Ausfall der Proteinfunktion führen. In diesem Fall könnte das endogene *CIC* diesen Funktionsausfall kompensiert haben. Auch die Proliferationsrate der transfizierten Zellen

entsprach derjenigen von Wild Typ-HEK293T-Zellen. Hierbei sollte neben einer möglichen Kompensation der bei Mutation verloren gehenden Proteinfunktion durch endogenes CIC auch die Möglichkeit einer Kontaktinhibition der HEK293T-Zellen nicht außer Acht gelassen werden. Der nächste Schritt könnte eine Wiederholung der Experimente in Zellen ohne endogene *CIC*-Expression sein – entweder in Zellen mit *CIC*-Knockdown oder in Zellen, die sich von vorneherein durch eine noch geringere bis fehlende *CIC*-Expression auszeichnen (z.B. HeLa-Zellen).