



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Medizinische Fakultät Mannheim  
Dissertations-Kurzfassung**

**Über die Proteinbindung frei zirkulierender DNA (cfDNA)**

Autor: Maximilian Strauß  
Institut / Klinik: Institut für Klinische Chemie  
Doktorvater: Prof. Dr. M. Neumaier

Als zirkulierende freie DNA (cfDNA) wird im Blutplasma oder anderen Körperflüssigkeiten außerhalb von Zellen vorkommende DNA bezeichnet. Diese wird vorherrschend im Rahmen der Apoptose, aber auch beim nekrotischen Zelluntergang oder bei aktiver Bildung extrazellulärer Vesikel durch alle Zellen freigesetzt. Vor allem cfDNA im Blutplasma wird im Zusammenhang mit verschiedensten pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Körper untersucht und als vielversprechender Biomarker beim Monitoring von Tumorerkrankungen betrachtet. Zahlreiche Studien belegen eine diagnostische und prognostische Aussagekraft von Veränderungen der cfDNA im Rahmen verschiedener Tumorentitäten – z. B. durch den Nachweis tumorspezifischer Mutationen oder der Methylierung bestimmter Genabschnitte. Durch Liquid Profiling („liquid biopsy“) und Analyse der cfDNA können Informationen gewonnen werden, die ansonsten nur in wesentlich invasiveren Gewebebiopsien zugänglich wären.

Wenig ist bisher zu Interaktionen der cfDNA mit weiteren Bestandteilen des Blutplasmas bekannt. Ausgehend von der Beobachtung, dass methylierte DNA-Fragmente im Blutplasma stabiler sind als nicht-methylierte, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern Proteine aus dem Blutplasma an cfDNA binden und ob die Methylierung der DNA einen Einfluss auf diese Bindung hat. Hierzu wurde eine neue Methode etabliert, mit der im Format eines Pull-down-Assays die Interaktion von Plasmaproteinen mit unterschiedlichen DNA-Fragmenten analysiert werden kann. Dies erfolgte anhand enzymatisch methylierter bzw. unmethylierter Amplikons aus dem RASSF1A-Promotor sowie einem Amplikon aus einem Intron des RASSF1A-Genes. Es zeigte sich eine spezifische Bindung von Plasma-Fibronectin an die DNA sämtlicher eingesetzter Amplikons. In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Amplikons aus dem Promotorbereich mit einer signifikant höheren Affinität gebunden werden als die Amplikons aus dem Intronbereich. Unterschiede zwischen den methylierten und unmethylierten Amplikons ließen sich jedoch nicht feststellen. Zudem zeigte sich, dass histongebundene DNA-Fragmente bzw. Oligonukleosomen kein Fibronectin binden, was darauf hindeutet, dass die für die Interaktion erforderlichen Sequenzen im intakten Nukleosom verdeckt sind oder es zu sterischen Behinderungen der Bindung kommt. Diese Ergebnisse zeigen, dass ungebundene cfDNA im Blutplasma mit Fibronectin interagiert und dass diese Interaktion vermutlich in einem Sequenzzusammenhang steht, nicht jedoch von der Cytosin-Methylierung abhängt. Gleichzeitig legen die unterschiedlichen Bindungsergebnisse in Promotorsequenzen und Intronsequenzen nahe, dass eventuell Sequenzen mit den Eigenschaften eines Promotors bevorzugt werden könnten. Für weitergehende Aussagen sind jedoch umfangreichere Untersuchungen zu Sequenzmotiven erforderlich. Eine spezifische Bindung weiterer Plasmaproteine an die Amplikons konnte nicht nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung der vielfältigen Funktionen von Plasma-Fibronectin, u. a. als Immunmodulator oder regulierendem Faktor bei der Blutgerinnung, ergeben sich durch den Nachweis einer Interaktion mit der cfDNA Fragen hinsichtlich eines möglichen Einflusses dieser Bindung auf die deren Biomarkerfunktion. Vor dem Hintergrund hoch variabler Fibronectinkonzentrationen im Rahmen verschiedener Krankheitszustände sowie einer möglichen Sequenzspezifität der Interaktion sind hier vielfältige Zusammenhänge mit weiteren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen möglich.