

Christoph Michael Hübener
Dr. med.

Sequenz, genomische Organisation und chromosomale Lokalisation der Gene von TRIM und SIT, zwei neuen transmembranären Proteinen der lymphozytären Signaltransduktionskaskade

Geboren am 29.10.1972 in Bochum

Reifeprüfung am 02.06.1992 in Bochum

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis WS 2000/2001

Physikum am 28. März 1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg und Poitiers, Frankreich

Praktisches Jahr in Yverdon / Lausanne, Schweiz; New York City, USA; und Heidelberg

Staatsexamen am 30.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. B. Schraven

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung der beiden humanen Adaptorproteine TRIM und SIT auf genomischer Ebene. Diese Moleküle gehören in die Gruppe von transmembranären Adaptorproteinen und sind integraler Bestandteil der lymphozytären Signaltransduktionskaskade.

Genomische Klone der beiden Gene wurden durch Hybridisieren einer humanen PAC-Genbibliothek isoliert und die Exon-Intron-Organisation und 2kb Promotorregion durch Sequenzierungen analysiert. Zusätzlich wurde die Promotoraktivität *in vivo* durch transiente Transfektionsexperimente nachgewiesen. Der Transkriptionsstart wurde im RNase-Protektionsassay ermittelt. Schließlich wurde der TRIM und SIT Genlocus durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bestimmt.

TRIM ist ein T-Zell spezifisches 29/30 kD transmembranäres Adaptorprotein, welches mit dem T-Zellrezeptor assoziiert und komoduliert. Das TRIM Gen hat eine Größe von ca. 31,8kb und besteht aus sechs Exons (34-1248bp) und fünf Introns (2,0-8,2kb). Die Exon-Intron-Grenzen entsprechen den klassischen Donor- und Akzeptormotiven für Spleißstellen.

Einer Spleißvariante der TRIM mRNA fehlen 111 Nukleotide, die exakt dem Exon 2 entsprechen. Da dieses für die Transmembranregion codiert, zeigt die TRIM Variante *in vitro* eine veränderte subzelluläre Lokalisation (zytoplasmatisch/nukleär im Gegensatz zu transmembranär) und damit eine möglicherweise andere biologische Funktion.

Die Analyse der genregulatorischen Einheit von 1,9kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts zeigt, daß TRIM keine klassische TATA Box oder einen klassischen Transkriptionsinitiator (Inr) enthält. Der RNase-Protektionsassay ergab zwei Transkriptionsstartpunkte (Position -156 und -140). In der Promotorsequenz finden sich verschiedene Bindungsmotive für sowohl

ubiquitäre als auch lymphozytenspezifische Transkriptionsfaktoren. Zu den letzteren gehören Ikaros, GATA, TCF-1 und LEF-1, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von T-Lymphozyten spielen.

Die Promotoraktivität des sequenzierten Fragments wurde durch transiente Transfektion eines Luciferase-Reportergen-Konstrukts in Jurkat-T-Zellen überprüft. Dabei wurde eine starke Transkriptionsaktivität des Promotors nachgewiesen.

Der TRIM Genlocus liegt auf Chromosom 3q13. Dieser Locus wurde kürzlich in einer genomweiten Linkage-Studie als neuer Suszeptibilitätslocus der Rheumatoiden Arthritis (RA) identifiziert. Die Klärung der Funktion des TRIM Gens als T-Zellrezeptor assoziiertes Molekül in der Pathogenese der T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung RA bedarf noch weiterer Studien.

Das lymphozytenspezifische 30/40kD transmembranäre Adaptorprotein **SIT** zeigt in der T-Zell-Signaltransduktion einen negativ regulatorischen Effekt auf die TCR-vermittelte T-Zellaktivierung. Das SIT Gen mit einer Größe von 1,8kb besteht aus fünf Exons (59-788bp) und vier Introns (86-116bp). Die Exon-Intron-Grenzen folgen der gt-ag Regel für Spleißstellen.

Die 2,5kb große Region 5' des Transkriptionsstarts enthält verschiedene homologe Bereiche und konnte nur durch Subklonierung und unidirektionale Deletion sequenziert werden. Im RNase-Protektionsassay konnten zwei Transkriptionsstartpunkte an Position -76 und -73 gezeigt werden.

Auch in der Promotorregion des SIT Gens finden sich keine klassischen Transkriptionsinitiationselemente (TATA, Inr). Transkriptionsfaktorbindungsmotive sind für ubiquitäre und lymphozytenspezifische Faktoren vorhanden (Ikaros, GATA, NF- κ B). Der SIT Promotor zeigte ebenfalls starke Promotoraktivität in Jurkat-T-Zellen.

Die genomische Lokalisation des SIT Gens ist Chromosom 9p12-13, ein Genlocus, der gehäuft bei chromosomalen Veränderungen von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) beschrieben wurde. Aufgrund der Rolle des SIT Gens als negativ regulatorisches Molekül in der Lymphozytenaktivierung läßt sich über eine Funktion in der Entstehung dieser Tumoren spekulieren.