

Bernd Elser
Dr.med.

Über die Bindung an Heteroduplex-Desoxyribonukleinsäure durch zwei transkriptionelle Repressorproteine, das Krüppel-assoziierte Box (KRAB)-Zinkfingerprotein Kid-1 und das Wilms-Tumor Protein WT-1

Geboren am 22. 10. 1971 in Ludwigshafen
Reifeprüfung am 29. 5. 1991 in Neustadt
Studiengang der Fachrichtung Humanmedizin vom SS 1992 bis SS 1998
Physikum am 12. 4. 1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 4.11.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. W. Kriz

Zinkfingerproteine der C₂H₂-Klasse stellen eine große Gruppe von DNA-bindenden Proteinen dar, die mehrere hundert Mitglieder enthält. Eine Untergruppe umfaßt die Zinkfingerproteine mit KRAB-Domäne, einer hochkonservierten Domäne mit transkriptioneller Repressorfunktion. Obwohl vermutlich ein Drittel aller Zinkfingerproteine eine KRAB-Domäne enthält, sind bisher noch keine DNA-Bindungsstellen beschrieben worden.

Es gelang mir nun, die Bindung des Zinkfingerproteins Kid-1, einem nierenspezifischen Transkriptionsfaktor mit KRAB-Domäne, an die Struktur einer Heteroduplex darzustellen. Eine PCR-Amplifikation- und Gelelektrophorese-gestützte Methode, die separat für einzelsträngige und doppelsträngige Oligonukleotide durchgeführt wurde, ergab keine Bindungsstelle für Kid-1. Jedoch erkannte Kid-1 Heteroduplices, die aus willkürlich gewählten Oligonukleotiden bestanden, bei denen die 5'- und 3'-Enden komplementär, die Nukleotide in der Mitte jedoch nicht komplementär waren. Kid-1 erkannte Heteroduplices mit größeren nicht-komplementären

Anteilen besser als Heteroduplices mit kleineren nicht-komplementären Anteilen. Sowohl die einzelsträngigen Oligonukleotide der Heteroduplex als auch eine doppelsträngige Homoduplex zeigten eine zu vernachlässigende Bindung an Kid-1.

Da eine der Heteroduplex ähnliche Struktur bei der Transkription von DNA auftritt, wenn die beiden DNA-Stränge geschmolzen werden, könnte ein potentieller Repressionsmechanismus von Kid-1 und anderen Zinkfingerproteinen mit KRAB-Domäne folgendermaßen aussehen: Nach der Erkennung einer Heteroduplex rekrutiert Kid-1 mit Hilfe von KRIP-1, einem KRAB-interagierenden Protein, nicht-histonische chromosomale Proteine, die über Bildung von kondensierten Heterochromatinstrukturen zu einer transkriptionellen Repression führen. Fraglich ist jedoch, ob Kid-1 in vivo eine solche „Transkriptionsblase“ erkennt, da durch den Initiationskomplex mit der RNA-Polymerase II die Größe der zugänglichen und geschmolzenen DNA eingeschränkt wird und Kid-1 an kleinere Heteroduplices nur schwach bindet.

Obwohl das POU-Domänenprotein Oct-6 und das ets-Domänenprotein Ets-1 nicht an Heteroduplex-DNA banden, konnte sowohl für WT-1-KTS als auch für WT-1+KTS eine starke Bindung an Heteroduplex-DNA nachgewiesen werden. WT-1-KTS band an Heteroduplex mit ähnlicher Stärke wie an die Egr-1-Konsensussequenz. Nachdem für die beiden WT-1-Isoformen schon mehrere sequenzabhängige Bindungsstellen charakterisiert wurden, konnte hier nun zusätzlich die sequenzunabhängige Bindung an die Struktur einer Heteroduplex dargestellt werden. Da für die WT-1-Isoformen eine Kollokalisierung mit Transkriptionsfaktoren und fraglich auch mit Splicingfaktoren besteht, ist eine interessante Hypothese sicherlich, daß WT-1 nach Erkennen einer Heteroduplex lenkend auf die Transkription und das Splicing einwirkt. Offen ist allerdings, ob die bei der Transkription geschmolzene DNA ausreichend groß und zugänglich ist

und ob nicht nur eine räumliche Kolokalisation von WT-1 mit Transkriptions- und möglicherweise auch Splicingfaktoren besteht, sondern auch eine funktionelle Interaktion.

Hiermit konnte die Struktur einer Heteroduplex als ein neues Motiv für DNA-bindende Proteine charakterisiert werden. Die Struktur einer Heteroduplex stellt aber nicht nur die erste DNA-Bindungsstelle für Zinkfingerproteine mit KRAB-Domäne dar, sondern ist auch ein Bindungsmotiv, das von anderen Zinkfingerproteinen erkannt wird.