
Systematische Analyse von Transkripten aus humaner fetaler Wachstumsfuge - Klonierung und Charakterisierung von Kandidatengen der Zelldifferenzierung

Zusammenfassung

Ziel der Doktorarbeit am Institut für Humangenetik war die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung medizinisch relevanter neuer Gene aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichen fetalen Knorpelgewebe. Für die Auswertung der Gensequenzen der cDNA-Bibliothek wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit 1050 EST-Klone untersucht. Insgesamt wurden im Rahmen einer Kooperation (Prof. Winterpacht, Hamburg/Erlangen; Prof. Zabel, Mainz und Firma GENterprise) 4748 EST-Klone der cDNA-Bibliothek durch die drei Kooperationspartner analysiert. Um bereits bekannte Gensequenzen in der Genbibliothek von unbekanntem Gensequenzen zu trennen, wurden alle Sequenzen (EST-Klone) in bioinformatischen Analysen in Nukleinsäure- und Proteindatenbanken auf Homologien zu bekannten Gen- und Proteinsequenzen untersucht. Der Vergleich der Sequenzanalysen von 4748 EST-Klonen des gesamten Projekts zeigte, dass 72,2% der analysierten Klone signifikante Homologien zu bekannten cDNA Sequenzen und Genen besitzen (Kategorie I). Weitere 10,3% der Klone zeigten Homologie zu uncharakterisierten cDNAs und Proteinen (Kategorie II) während 14% der Klone keine Homologien oder Homologien zu genomischen Sequenzen oder uncharakterisierten ESTs zeigten (Kategorie III). Aus den Gensequenzen, die keine Homologien zu bekannten Genen und Proteinen aufweisen (Kategorie II und III), wurden im Rahmen dieser Arbeit einzelne Klone ausgewählt und weitergehend untersucht. Die detaillierte Analyse eines Klons mit auffälligen strukturellen Merkmalen führte dabei zur Identifizierung und Klonierung eines bisher unbekanntem menschlichen und murinen Gens, welches auf Chromosomen 1p36 bzw. Maus Chromosom 4 lokalisiert ist und als *SPOCI* (survival time – associated PHD protein in ovarian cancer) bezeichnet wurde. Das neu identifizierte Gen besteht aus 4 Exons und enthält eine PHD-Domäne (Plant Homeodomain). Proteine mit dieser Domäne haben häufig eine Funktion bei der Transkriptionsregulation. Expressionsanalysen in öffentlichen Datenbanken zeigten, dass *SPOCI* in vielen Geweben und auch während der Entwicklung beschrieben wird. Eine verstärkte Expression konnte auch in Geweben aus Ovarialkarzinomen und verschiedenen anderen Tumor-Arten nachgewiesen werden. Northern-Analysen bestätigten die Expression von *SPOCI* in zahlreichen menschlichen und murinen Geweben und embryonalen Stadien. Weiterhin konnte mit Hilfe von RNA in situ-Hybridisierungen nachgewiesen werden, dass murines *SPOCI* sowohl in den Spermatozyten als auch in Uterus-Gewebe in den Zellen des Stratum

functionale des Endometriums exprimiert wird. Von beiden Zelltypen ist bekannt, dass sie im Menschen an der Entwicklung von Tumoren (Keimzell-Tumore bzw. Tumore des Endometriums) beteiligt sind. Untersuchungen der subzellulären Lokalisation mit Hilfe von FLAG-*SPOCI*- und *SPOCI*-EGFP-Fusionsproteinen und einem polyklonalen Peptidantikörper gegen *SPOCI* zeigten in menschlichen Zelllinien, dass es sich bei *SPOCI*, wie aufgrund der Proteindomänen vermutet, um ein im Zellkern lokalisiertes Protein handelt. In Kolokalisationsexperimenten konnte zudem nachgewiesen werden, dass *SPOCI* mit *RNA-Polymerase II* und dem Transkriptionsfaktor *E2F-1* eine partielle, aber deutliche Kolokalisation zeigt. Die Assoziation mit den transkriptionsaktiven Bereichen des Zellkerns unterstreicht die mögliche Beteiligung von *SPOCI* an der Regulation der Transkription. Es wird vermutet, dass es sich bei der im *SPOCI*-Protein enthaltenen PHD-Domäne um eine Protein-Protein Interaktionsdomäne handelt, welche Interaktionen verschiedener Proteine und Proteinkomplexe vermittelt, die an der Reorganisation der Chromatinstruktur beteiligt sind. Untersuchungen des Effektes des *SPOCI*-Proteins auf die Transkription, mit Hilfe des Gal4-Luziferase-Reporter-Assays, unterstützen diese Vermutung. Die Expression eines Gal4DBD-*SPOCI*-Fusionsproteins zeigte eine stark reprimierende Wirkung auf die Expression des Luziferase-Reportergens. Es ist daher möglich, dass *SPOCI* an der Assoziation von Proteinkomplexen beteiligt ist, die durch Reorganisation der Chromatinstruktur eine Repression der Transkription vermitteln können.

Untersuchungen der Expression von *SPOCI* in Tumorgewebe aus humanen Ovarialkarzinomen und rezidivierenden Ovarialkarzinomen durch Prof. Hengstler (Leipzig) zeigten, dass eine erhöhte *SPOCI*-mRNA Expression mit einer schlechten Prognose für Patienten mit primären und rezidivierenden Ovarialkarzinom assoziiert ist. Die Überlebenszeit von Patienten mit einer erhöhten *SPOCI*-Expression ist erheblich geringer, als die Überlebenszeit von Patienten mit einer schwachen *SPOCI*-Expression.

Aufgrund der Ergebnisse unserer Untersuchungen vermuten wir, dass *SPOCI* als ein prognostischer Marker für das Ovarialkarzinom verwendbar sein könnte.

Aufgrund der möglichen Funktion von *SPOCI* als prognostischer Marker und der Bedeutung als mögliches Therapieziel, haben wir *SPOCI* als Patent angemeldet: (K203 (*SPOCI*): ein neuer Transkriptionsregulator als „drug target“ und molekularer Marker für Prognose, Therapieresistenz und Residualtumor bei Ovarialkarzinomen und anderen Tumorerkrankungen).