

# Expression and functional analysis of *EFNB1* mutations in craniofrontonasal syndrome

Dipl.-Genet. Roman Makarov

## Zusammenfassung (Deutsch)

Das Protein Ephrin-B1 bildet einen Signalkomplex mit dem EphB-Rezeptor, der in komplementären Zellen exprimiert wird. Es wurde gezeigt, dass dieser Komplex als ein bidirektionales Signalsystem funktioniert und deswegen wurde Ephrin-B1 als Rezeptor-ähnliches Protein benannt. Ephrin-B1 wird vom *EFNB1* Gen kodiert. Mutationen des *EFNB1*-Gens verursachen eine X-chromosomale Erkrankung – das Craniofrontonasale Syndrom (CFNS). Diese Erkrankung zeigt ein ungewöhnliches Vererbungsmuster: heterozygote Frauen weisen das Vollbild der Erkrankung auf, während hemizygoten Männer keine oder nur eine leichte Symptomatik zeigen, obwohl das *EFNB1* Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und kein homologes Gen auf dem Y-Chromosom hat. Dieses Vererbungsmuster wurde durch zufällige X-Inaktivierung bei heterozygoten Frauen und als Folge der zellulären Interferenz erklärt. Die zelluläre Interferenz entsteht durch Ergebnis von mutierten und Wildtypzellen mit EphB-Rezeptor exprimierenden Zellen. In dieser Arbeit wurden einige *EFNB1* Mutationen die bei Patienten identifiziert werden, untersucht. Die Arbeit besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil beinhaltet die Analyse von drei Mutationen, die eine vorzeitige Termination (PTC, premature termination codon) verursachen: Leseraster Mutation c.614\_615delCT (PTC in Exon 4) und Spleiß-Mutation c.406+2T>C (PTC in Intron 2 oder Exon 3). Es wurde vorhergesagt, dass die Anwesenheit jeder dieser Mutationen zur Bildung einer verkürzten, löslichen Form des Ephrin-B1 Proteins führt. Dieses verkürzte Protein könnte eine Blockierung des EphB-Rezeptors bewirken. Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die Untersuchung der Missense Mutationen c.161C>T/p.P54L und c.332C>T/p.T111I auf das Zellenverhalten und die Ephrin-B1 Signaltransduktion. Die Auswirkungen dieser Mutationen wurde im Zellkulturmodell unter Anwendung von NIH3T3 Fibroblasten analysiert. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, weil sie kein Ephrin-B1 der Maus exprimiert. Beide Missense Mutationen sind in der extrazellulären Ephrin-Domäne

lokalisiert. Diese Domäne kann zur Erkennung von Eph-Rezeptor und Ephrin-B1 und zur Bildung eines hoch-komplexen Multiproteins beitragen. Bei der Durchführung des reversen Ephrin-B1 Signals ist die Phosphorylation der bestimmten evolutionär konservierten Tyrosin-Reste des zytoplasmatischen Anteiles notwendig. Es wurde gezeigt, dass die beiden Tyr324 und Tyr329 im menschlichen Ephrin-B1 Protein besonders wichtig für die Signaltransduktion sind. Um zu analysieren, welche Rolle Missense Mutationen bei der Ephrin-B1 Signaltransduktion spielen, untersuchte ich die Phosphorylierung dieser zwei Aminosäuren bei Mutanten und Wildtyp Ephrin-B1 nach der EphB2-Fc Stimulation. Frühere Ergebnisse zeigten, dass Ephrin-B1 Protein den STAT3 Signalwege aktiviert. Es ist auch bekannt, dass STAT3 die Expression des *TWIST1* Gens kontrolliert und das *MSX2* Gen in den STAT3 Signalwege integriert ist. Aus diesem Grund wurde Expression des *MSX2* Gen und *TWIST1* Gens in Antwort auf die Ephrin-B1 Stimulation untersucht. Jedoch konnte keine Veränderung in der Expression dieses Gen festgestellt werden.

Es wurde gezeigt:

1. Mutation c.377\_384delTCAAGAAG weist eine starke Reduzierung der Expression des mutant Allels auf. Mutationen c.614\_615delCT und c.406+2T>C zeigten die Expression des mutant Allels, aber kein mutant Protein war zu finden.
2. Mutation p.P54L weist keine Tyr324/329 Phosphorylation auf, Wildtyp und p.T111I Mutation demonstrierten nur geringe Differenzen zwischen den Phosphorylation Zeit.
3. *MSX2* und *TWIST1* Gene zeigten geringe Differenzen in der Änderung der Expression in Antwort auf die Ephrin-B1 Stimulation.