

Birgit Liliensiek

Dr. sc. hum.

**Untersuchung der biologischen Relevanz TNF- $\alpha$  supprimierter, endothelialer Gene nach verschiedenen Stimuli *in vitro* und unter pathophysiologischen Bedingungen *in vivo***

Geboren am 25.08.1965 in Osnabrück

Reifeprüfung am 03.06.1986 in Osnabrück

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1986 bis SS 1992

Vordiplom am 23.11.1988 an der Universität Osnabrück

Diplom am 18.05.1992 an der Universität Osnabrück

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. P. P. Nawroth

Die biologische Relevanz von 6 TNF- $\alpha$  supprimierten, aus einer subtraktiven Genbank klonierten, endothelialen Rindergenen konnte mit Hilfe von verschiedenen Versuchsansätze *in vitro* und *in vivo* ermittelt werden.

Zellkulturüberstände unbehandelter und mit TNF- $\alpha$  stimulierter BAEC wurden isoliert, mit wachsenden Fibroblasten oder verwundeten, einschichtigen Fibroblastenkulturen inkubiert und die Proliferations- beziehungsweise die Migrationsgeschwindigkeiten verglichen. Geringere Proliferations- und Migrationsgeschwindigkeiten der Fibroblasten, die mit Zellkulturüberstand TNF- $\alpha$  vorbehandelter BAEC inkubiert wurden, zeigten, daß TNF- $\alpha$  in BAEC die Sekretion von Mitogenen für Fibroblasten reduziert. Eine der zu untersuchenden, klonierten, endothelialen cDNA's kodiert für den Wachstumsfaktor CTGF. CTGF wurde in kultivierten BAEC auf Transskriptionsebene nach 30minütiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  unabhängig von einer Proteinneusynthese supprimiert und die Halbwertszeit der CTGF mRNA von 140 Minuten auf 70 Minuten verkürzt. Aufgrund dieser Eigenschaften konnte CTGF als "immediate early" Gene deklariert werden. Das Rinder CTGF ist ein sekretiertes, aus 349 Aminosäureresten bestehendes Protein mit einer sekretorischen Signalsequenz und einem Cysteingehalt von 11,7%. Die Rinder CTGF Proteinsequenz, resultierend aus der cDNA

Sequenz, hat 92,3% Homologie zum humanen und 89,1% Homologie zum Maus CTGF (FISP-12). Mit Hilfe eines Antisense CTGF Oligonukleotids konnte gezeigt werden, daß die Suppression der CTGF mRNA durch TNF- $\alpha$  zur reduzierten Sekretion mitogener Aktivität durch BAEC führt. Die Proliferation und Migration von Fibroblasten, die z. B. im Verlauf der Wundheilung erforderlich ist, wird von Endothelzellen *in vitro* durch die Sekretion des Wachstumsfaktors CTGF kontrolliert, dessen Expression wiederum negativ durch TNF- $\alpha$  beeinflusst wird. Die Suppression von CTGF durch TNF- $\alpha$  stellt eine potentielle Interventionsmöglichkeit bei Wundheilungsstörungen als Begleiterscheinung von Erkrankungen mit erhöhten TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Plasma dar.

Spontan Lebermetastasen bildende ESbl-*lacZ* Lymphomzellen wurden in immunkompetente oder immuninkompetente Mäuse injiziert, bis zur maximalen Metastasengröße inkubiert, *ex vivo* die sinusoidalen Leberendothelzellen isoliert und die Genexpression der 49 TNF- $\alpha$  supprimierten Gene untersucht. Für 4 der untersuchten Gene wurde eine Expressionsänderung in gesunden, sinusoidalen Endothelzellen aus dem Zielorgan der Metastasierung in Abhängigkeit vom Immunstatus der tumortragenden Mäuse bei maximaler Metastasengröße nachgewiesen. Mittels Sequenzanalyse konnten die Gene als Polyubiquitin (A4), Elongationsfaktor 1 $\alpha$  (B2), saures, ribosomales Phosphoprotein PO (C3) und ribosomales Protein S2 identifiziert werden. Diese Gene sind am Proteinstoffwechsel beteiligt und wurden uniform in tumortragenden, immunkompetenten Mäusen supprimiert, während sie in tumortragenden, immuninkompetenten Mäusen induziert wurden. In kultivierten BAEC wurden die Gene durch TNF- $\alpha$  und/oder ESbl-*lacZ* Lymphomzell konditionierten Zellkulturüberstand supprimiert, wobei die Suppression durch Koinkubation von TNF- $\alpha$  und konditionierten Zellkulturüberstand verstärkt wurde.

Für die Untersuchung der Genexpression wurde desweiteren ein akutes Lebertransplantationsmodell verwendet. Rattenlebern wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, 2 und 6) der Abstoßungsreaktion entnommen und für die Isolation von Gesamt-RNA sowie Proteinen verwendet. Genexpressionuntersuchungen der erwähnten 49 Gene auf RNA-Ebene zeigten, daß die Expression von Polyubiquitin (A4) und Fibronectin (A8) durch die akute Abstoßungsreaktion modifiziert wurde. Die Polyubiquitin mRNA (A4) wurde im untersuchten Zeitraum supprimiert, während eine geringere Proteinmenge erst am letzten Tag (Tag 6) der Abstoßungsreaktion detektiert wurde. Fibronectin (A8) wurde auf RNA-Ebene

zunächst induziert. Die Zunahme der Fibronectinproteinmenge (Tag 1) konnte vor der Induktion des Transskripts (Tag 2) nachgewiesen werden. Am Tag 6 der Abstoßung war Fibronectin auf RNA- sowie auf Proteinebene supprimiert.