

Sandra Wüst
Dr. med.

Klonierung einer spezifisch in Endothelzellen exprimierten cDNA und deren Identifikation als PTRF (Polymerase I and Transcript Release Factor).

Geboren am 05.05.1973 in Pforzheim
Reifeprüfung am 20.05.1992 in Königsbach-Stein
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000/2001
Physikum am 13.03.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 29.05.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Peter P. Nawroth

Im Rahmen einer endothelialen Aktivierung moduliert TNF- α durch zeitlich koordinierte Induktion und Suppression zahlreicher Gene den Phänotyp von Endothelzellen, und beeinflusst als Folge grundlegende endotheliale Eigenschaften. Die zytokin-medierte endotheliale Aktivierung ist wesentlicher Bestandteil der Pathogenese entzündlich vaskulärer Erkrankungen wie der Atherosklerose und abdomineller Aortenaneurysmen. Während die Bedeutung des Endothels für die Pathogenese der Atherosklerose in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Forschung war, ist sie für abdominelle Aortenaneurysmen weniger systematisch untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Klonierung des offenen Leserasters des humanen Homologes der unbekannt, endothelzell-spezifisch exprimierten bovinen cDNA C7. In Vorarbeiten konnte C7 aus einer subtraktiven bovinen Aortenendothelzell-cDNA-Bank isoliert werden, die mit Genen angereichert war, die mindestens 6 Stunden durch TNF- α supprimiert waren. Eine TNF- α medierte zeit- und dosisabhängige Suppression von C7 in BAEC war vorbereitend in unabhängigen Experimenten bestätigt worden. Eine Expressionsanalyse von C7 in fortgeschrittenen humanen atherosklerotisch veränderten abdominellen Aortenaneurysmen mittels In-Situ-Hybridisierungen zeigte außerdem eine endothelzell-spezifische Überexpression des Gens in Gefäßwandabschnitten, die kein entzündliches Infiltrat aufwiesen. In Kontrollgefäßen und entzündlich infiltrierten humanen atherosklerotisch veränderten abdominellen Aortenaneurysmen war C7 nicht detektierbar. Die Identifikation des Gens sollte weitere Einblicke in die pathogenetische Bedeutung des Endothels in der Entwicklung entzündlich vaskulärer Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose und von abdominellen Aortenaneurysmen, ermöglichen.

Die Vollängenklonierung von C7 gestaltete sich problematisch. Insgesamt drei methodische Ansätze waren erforderlich um das offene Leseraster des Genes zu klonieren. Zum Einen erfolgte die Untersuchung einer phagenbasierten cDNA-Bank aus humanen venösen Endothelzellen (HUVEC), zum Anderen wurde eine PCR basierte Strategie (RACE-PCR) verfolgt, die eine Amplifikation der gesuchten Sequenz in 5'-Richtung ermöglichen, und die Klonierung zeitlich verkürzen sollte. Doch einzig die Untersuchung der „High-Density cDNA Filter Arrays“ des RessourcenZentrum/PrimärDatenbank (RZPD), Berlin (www.rzpd.de) erwies sich als ausreichend sensitiv und spezifisch in der Detektion positiver humaner Klone von C7. Nach Klonierung des offenen Leserasters des humanen Homologes, ermöglichte eine Recherche in den etablierten Nukleotidsequenz-Datenbanken sowie verifizierende Experimente die Identifikation der bovinen cDNA C7 als PTRF (Polymerase I and Transcript Release Factor).

Trotz letztlich fehlender Beweislage scheint am ehesten das lange, nicht translatierte 3'-Ende der in dieser Arbeit isolierten cDNA von PTRF eine ursächliche Bedeutung für die erschwerte Klonierung in 5'-Richtung gehabt zu haben. Die geringe Homologie zwischen der bovinen cDNA C7, die in Hybridisierungsexperimenten als Sonde eingesetzt wurde und für die nicht translatierte 3'-Region des bovinen Gens PTRF kodierte sowie der nicht translatierten 3'-Region des humanen Homologes, hatte eine verminderte Sensitivität sämtlicher in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsexperimente zur Folge. Außerdem scheint eine ausgeprägte Sekundärstrukturbildung innerhalb CG-reicher Sequenzabschnitte der 3'-NTR des bovinen Gens von PTRF die plausibelste Erklärung für die fehlende Effizienz der molekularen Klonierungsstrategie mittels PCR zu sein. Das Screening von cDNA Filter Arrays hat sich in dieser Arbeit als effiziente Strategie zur Klonierung unbekannter cDNAs erwiesen. Sie erzielte auch unter ungünstigen experimentellen und genstrukturellen Voraussetzungen sensitive und spezifische Ergebnisse. Eine, insbesondere endothelzell-spezifische, Bedeutung von PTRF für die Pathogenese vaskulärer Erkrankungen konnte, auf der Basis der alleinigen Identifikation des Gens sowie der Recherche der aktuellen Literatur, nicht ohne weiteres abgeleitet werden.