

Christine Fallsehr
Dr. sc. hum.

Identifizierung und Validierung differentiell exprimierter Gene in frühen Reperfusionphasen nach partieller warmer Leberischämie im Rattenmodell

Geboren am 20.05.1971 in Freiburg i. Br.
Diplom der Fachrichtung Biologie am 10.12.1996 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. M. v. Knebel Doeberitz

Durch Zunahme der Indikationen und Abnahme der Kontraindikationen zur Lebertransplantation, aber im Besonderen durch den sich immer prägnanter abzeichnenden Organmangel, ist leider eine rasch wachsende Transplantatwarteliste mit zunehmender Mortalität der Patienten eine ernüchternde Tatsache. Um so zwingender wird die Forderung, die zu wenigen verfügbaren Organe bestmöglichst zu erhalten und wichtige Risikofaktoren wie Schädigungen durch warme Ischämie und Reperfusion (WI/R) möglichst gering zu halten. Um dies zu bewerkstelligen sind spezifische und sensitive diagnostische Verfahren und Marker gefordert, die das Ausmaß der WI/R Schäden vorhersagen, bevor irreversible flächige Gewebeschäden bestehen, und sich die transplantierten Lebern nicht mehr regenerieren können. Leider existieren keine verlässlichen diagnostischen oder prognostischen Parameter zu dieser komplexen Problematik.

Mit diesem Ausgangspunkt sollten mit den Methoden der SSH und cDNA-Arrayhybridisierung umfangreiche Genexpressionsprofile in dem wissenschaftlich anerkannten Rattenmodell WI/R der Leber im Vergleich der abgeklemmten linken Leberlappen mit den korrespondierenden, während der Operation ständig mit Blut versorgten rechten Leberlappen erstellt werden. Als experimentelles Standardmodell wurde eine irreversible Ischämiedauer von 1h gefolgt einer sehr kurzen Reperusionszeit von 2h gewählt, da sich in den Rattenlebern zu diesem Zeitpunkt morphologisch noch keine flächigen, irreversiblen Schäden abzeichnen.

Nach beiden komplexen Strategien (SSH und cDNA-Array) konnten 32/42 vorselektionierten Kandidatengene zunächst in vier Lebern des Standardmodells, danach in einer Reperusionszeitkinetik nach 0h, 1h, 2h, 6h post Ischämie, durch Northern Blot Analysen verifiziert werden. In der Reperusionszeitkinetik wurden beide Versuchsgruppen (die abgeklemmten Leberlappen und korrespondierenden Kontroll-Leberlappen) gesunden vollkommen unbehandelten Rattenlebern gegenüber gestellt. Im Vergleich dieser beiden Versuchsgruppen zum basalen Expressionsstatus der unbehandelten Tiere wurden die meisten Gene erst 1-2 h nach der Reoxygenierung induziert, was durch den schnellen ATP-Mangel in der ischämischen Phase erklärbar ist. Die größten RNA-Mengen waren für die meisten untersuchten Gene 6 h nach dem Aufheben der Ligatur, korrelierend mit den höchsten AST Serumkonzentrationen zu diesem Zeitpunkt nachweisbar. Im Zusammenhang mit pathophysiologischen Veränderungen nach WI/R der Leber, ließen sich die verifizierten Markergene mehreren WI/R beteiligten Reaktionen zuordnen. Dies waren Gene kodierend für Proteine, die für protektive Mechanismen nach zellulärem Stress verantwortlich sind (z.B. Hitzschockproteine), Gene aus WI/R

beteiligten Signaltransduktionswegen (AP-1 Transkriptionsfaktoren), Apoptose relevante Gene, Gene involviert an inflammatorischen und immunologischen Antworten, aber auch im Leberstoffwechsel verankerte Gene. Die Identifikation von sechs funktionell nicht charakterisierten aber verifiziert differentiell exprimierten ESTs rechtfertigen die SSH als vorteilhafte Strategie zur Identifikation bislang noch unbekannter Gene. Diese stellen somit tatsächlich neue Marker in dem hier untersuchten WI/R Zusammenhang dar. Dreizehn funktionell charakterisierte Gene wurden nach Literaturrecherche zum ersten Mal als Leber WI/R Marker transkriptionell validiert, konnten aber teilweise Genfamilien zugeordnet werden, welche in der WI/R Pathophysiologie involviert sind. Exemplarisch konnten die transkriptionellen Daten für Hsp27, Hsp70, Jund, Gadd45a und IL-1RI auf die biologisch relevante Proteinebene in Western Blot Experimenten, für Hsp70 und Gadd45a zusätzlich auch immunhistochemisch übertragen werden.

Diagnostisch wertvolle potentielle WI/R Biomarker sind die Gene, welche nach WI/R ausschließlich in den postischämischen Leberlappen induziert oder verstärkt exprimiert werden. Hier dominieren in unseren Experimenten auf der einen Seite Hitzeschockgene, die vorzeitigem Proteinabbau nach zellulärem Stress wie I/R protektiv entgegenwirken. Es wurden Vertreter aller wichtigen Zellkompartimente identifiziert und verifiziert. Neben der Chaperonfunktion sind für Hsp27 und Hsp70 laut Literaturdaten auch antiapoptotische Wirkungen nachgewiesen. Zusammen mit Gadd45a, induziert nach DNA-Schädigungen, stellen sie empfindliche Marker dar, die zu diesen frühen Reperfusionzeitpunkten den zellulären Stress anzeigen obwohl sich die Lebern, nach durchgeführten morphologischen H&E Färbungen, noch in einem regenerierbaren Allgemeinzustand befanden. Insbesondere hervorzuheben ist das immunhistochemische Hsp70 Proteinlokalisationsmuster. In den ersten beiden Stunden der Reperusionsphase auf Gallengangszellen, sinusoidale und arterielle Endothelzellen restringiert, korrelierte die Hsp70 Färbung 6h nach warmer Ischämie mit vakuolisierten parenchymatischen Arealen im abgeklemmten Leberlappen. Die Hepatozytenvakuolisierung stellt reversible Leberschädigungen dar. Hsp70 reflektiert so die zeitliche Abfolge der pathophysiologischen Leberschädigungen nach WI/R. Dem gegenüber stehen die AP-1 Transkriptionsfaktoren Jun, Fos und Jund, die nach WI/R der Leber insbesondere als Heterodimere mit Jund proapoptotisch wirksam sind.

Wichtige Daten liefern allerdings auch die Expressionsprofile von Genen, die nur in den Kontroll-Leberlappen verstärkt exprimiert wurden. Die frühe postischämische hoch Regulation von Genen in diesem Leberkompartiment war unerwartet, deutet jedoch an, dass initiale Noxen wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1 oder ROS auch parakrin oder systemisch über die gesetzte Leberligatur hinaus schädigend wirken können. Neben drei ESTs kodierten die Gene mit diesem Expressionsprofil für proinflammatorische Proteine, und können lokal und systemisch schädigend für die gesamte Leber oder andere Organe sein. Die besten Ergebnisse hierbei wurden für den IL-1RI auf RNA- und Proteinebene demonstriert. IL-1RI ist ein potenter Rezeptor bei proinflammatorischen Prozessen. Insbesondere ist er wichtig bei der Signaltransduktion für $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, die eine zentrale Rolle bei den destruktiven Vorgängen nach WI/R inne haben.

Es wird deutlich, dass sich zu den hier untersuchten frühen Reperusionszeitpunkten protektive und destruktive Mechanismen die Waage halten. Als nächster Schritt sollten die hier identifizierten und nach WI/R verifiziert differentiell exprimierten und funktionell charakterisierten Gene aber vor allem die neuen Marker, repräsentiert durch die EST-Sequenzen, an größeren experimentellen und klinischen

Probenkollektiven untersucht werden. Neben den hier analysierten frühen Reperfusionzeitpunkten sind dann natürlich auch Zeitfenster wichtig, in denen Leberschädigungen detektierbar sind, die zum Organverlust führen. Allen voran sollten Hitzeschockproteine, AP-1 Transkriptionsfaktoren und Apoptose involvierte Proteine zumindest Teil des Markersets sein.