

Marion Hof  
Dr. med.

**Untersuchungen zur Genregulation und Lokalisation von  
Growth-Differentiation-Factor-15 (GDF-15), einem neuen Mitglied der Familie der  
transformierenden Wachstumsfaktoren- $\beta$  (TGF- $\beta$ )**

Geboren am 6.10.1975 in Kirchen/Sieg  
Staatsexamen am 8.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Unsicker

In der TGF $\beta$ -Superfamilie wird eine Gruppe strukturell verwandter, multifunktionaler Wachstumsfaktoren zusammengefasst. Kontextabhängig regulieren sie eine große Anzahl zellulärer Prozesse und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Homöostase und Reparatur von nahezu allen Geweben eukaryontischer Organismen.

Mit GDF-15 (Growth-Differentiation-Factor-15) wurde Ende der neunziger Jahre ein neues Zytokin dieser Superfamilie entdeckt. Eine GDF-15 mRNA-Expression wurde bereits in zahlreichen Gewebetypen von Maus, Mensch und Ratte nachgewiesen. Da diese unter pathologischen Bedingungen häufig deutlich erhöht ist, spielt GDF-15 möglicherweise auch bei zahlreichen Erkrankungen eine Rolle.

Nur wenige Studien haben sich bisher mit der genomischen Struktur und den Mechanismen der Transkriptionsregulation von GDF-15 beschäftigt. Ein Promotor konnte in der Region bis etwa -1100 bp 5' des Startcodons nachgewiesen werden. Untersuchungen an der Ratte zeigen dort zahlreiche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, deren Anordnung typisch für Gene ist, die eine Rolle in Wachstum und Entwicklung spielen.

In dieser Arbeit wurde zunächst die basale GDF-15 Promotorregulation in der Maus näher untersucht. Promotorfragmente wurden dafür zusammen mit einem Reportergen in einem Plasmidvektor durch eine Lipofektion in verschiedene Zelllinien übertragen. Eine Aussage über die Aktivität der Deletionsfragmente konnte mittels eines luminometrisch bestimmten Quotienten getroffen werden. Danach sind die für die basale Promotorregulation wichtigsten Elemente in einer Region von -118 bis -56 bp 5' des Startcodons lokalisiert. Eine computerunterstützte Analyse zeigte hier Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie Sp-1, NF-1 und LBP/LSF-1, denen eine wichtige Funktion bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen gemeinsam ist. Dies suggeriert, dass auch GDF-15 in diesem Bereich eine Rolle spielen könnte. Außerhalb dieser Region wurde weiter 3' auch eine TATA-Box identifiziert, die offenbar die Transkription nicht alleine initiiert, wie dies bei zahlreichen anderen Genen der Fall ist. Diese Funktion könnte beispielsweise durch eine GC-Box, eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp-1, übernommen werden.

Die Expression der Mitglieder der TGF $\beta$ -Familie wird kontextabhängig oft von anderen Wachstumsfaktoren beeinflusst.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer größeren Anzahl Zytokine auf den GDF-15 Promotor getestet. Dazu wurden mit einem GDF-15 Promotorfragment transfizierte Zellen mit den Wachstumsfaktoren inkubiert und die Promotoraktivität gemessen. Die vorbeschriebene Stimulation der GDF-15 Expression konnte für IL-1 und TNF $\alpha$ , jedoch

nicht für TGF $\beta$  bestätigt werden. Hingegen führt eine Inkubation mit TGF $\beta$  wie auch mit FGF-2, IL-2 und Persephin zu einer erniedrigten Aktivität des Promotors.

Alle genannten Wachstumsfaktoren haben einen Einfluss auf die dopaminergen Neurone des Mittelhirns, zusätzlich sind IL-1, IL-2, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und FGF-2 wichtige Elemente der Immunabwehr sowie der zellulären Antwort auf Stress. TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und FGF-2 spielen außerdem eine Rolle in der Tumorphagenese, Angiogenese, Metastasierung und der Apoptose. Da der GDF-15 Promotor von diesen Zytokinen reguliert wird, geben die Ergebnisse dieser Arbeit so möglicherweise Hinweise auf weitere biologische Funktionen von GDF-15.

Weil die basale Aktivität des Promotors in allen transfizierten Zelllinien überraschend hoch war und in der Zelllinie U373 eine nach der Transfektion neu aufgetretene GDF-15 Expression nachgewiesen werden konnte, wurde eine Beeinflussung der Promotoraktivität durch die Transfektion selbst vermutet. Durch eine Inkubation der transfizierten Zellen mit Antioxidantien wurde während der Transfektion entstehender, oxidativer Stress als Ursache ausgeschlossen. Neuere Studien zeigen jedoch eine durch die Lipofektion ausgelöste Synthese von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen, die proapoptotisch und antiinflammatorisch wirken. Da einige von diesen Bindungsstellen im GDF-15 Promotor zeigen, wäre so eine Stimulation der GDF-15 Promotoraktivität während der Transfektion möglich.

In einem weiteren Projekt sollte die Lokalisation von GDF-15 in der Maus näher charakterisiert werden. Ein histologischer Nachweis gelang zwar bereits durch eine In-Situ-Hybridisierung in der Ratte, ist jedoch insgesamt aufgrund der geringen Gewebekonzentration des Zytokins schwierig. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde eine transgene Maus generiert, bei der der GDF-15 kodierende Teil des GDF-15 Gens durch das LacZ-Gen ersetzt wurde. Sein Genprodukt ist das Enzym  $\beta$ -Galactosidase, deren Expression nun über den GDF-15 Promotor reguliert wurde. In dieser Arbeit wurde durch eine Enzymfärbung die Lokalisation der  $\beta$ -Galactosidase dargestellt. Dies erlaubte einen direkten Rückschluss auf Orte der GDF-15 Expression.

Obwohl fast alle Gewebetypen der Maus untersucht wurden, konnte eine Farbreaktion nur in Gewebe von Niere, Leber und Gl. Parotis gezeigt werden.

In der Niere kam es zu einer  $\beta$ -Galactosidase Expression im Glomerulus, im dünnen, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und in den Sammelrohren, die in der Nierenpapille besonders ausgeprägt war. Dort sind die Zellen durch starke Osmolaritätsschwankungen einem äußerst ungünstigen intra- und extrazellulären Milieu ausgesetzt. Möglicherweise führt hier zellulärer Stress zu einer gesteigerten GDF-15 Expression, wie es bereits in mehreren Studien in der Niere und anderen Organen beschrieben wurde.

Weiterhin stimmte die Verteilung der gefärbten Zellen auffällig mit der Lokalisation der Harnstofftransporter UT-A1 und UT-A2 überein. Zukünftige Untersuchungen sollen klären, ob GDF-15 in deren Regulation eine Rolle spielt.

In der Leber wurden unterschiedliche Zelltypen angefärbt, die morphologisch Hepatozyten und Makrophagen entsprechen. Ihre Verteilung lässt jedoch keinen Rückschluss auf eine mögliche Funktion von GDF-15 in der Leber zu. In der Gl. Parotis konnte ebenfalls nur eine sehr geringe Anzahl gefärbter Zellen identifiziert werden. Möglicherweise kommt es auch hier erst unter pathologischen Bedingungen zu einer verstärkten GDF-15 Expression.

In mehreren Studien wurde eine GDF-15 RNA-Expression auch in zahlreichen anderen Zell- und Gewebetypen nachgewiesen. Da GDF-15 wie viele Zytokine im gesunden Gewebe nur in einer geringen Konzentration vorliegt, reicht die in gleicher Menge produzierte  $\beta$ -Galactosidase in diesen Organen wahrscheinlich nicht aus, um eine Farbreaktion hervorzurufen.