

Elektronische Prüfungsarbeiten



Titel der Arbeit:

Functional epithelial cell proteomics under conditions of chronic intestinal inflammation

Übersetzter Titel:

Funktionelle Proteomanalyse von intestinalen Epithelzellen unter chronischer Entzündung

Autor:

Shkoda, Anna

Jahr:

2007

Dokumenttyp:

Dissertation

Institution:

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan

Betreuer:

Haller, Dirk (Univ.-Prof. Dr.)

Gutachter:

Görg, Angelika (apl. Prof. Dr.)

Sprache:

en

Fachgebiet:

BIO Biowissenschaften; MED Medizin

Kurzfassung:

In this study we used IL-10 gene deficient mice monoassociated with Gram-positive Enterococcus faecalis in order to characterize bacteria-epithelial interactions and host-derived mechanisms involved in the regulation of chronic intestinal inflammation in genetically susceptible host. We showed that intestinal epithelial cells (IEC) of IL-10^{-/-} mice lack protective TGF β /Smad signalling and fail to inhibit expression of NF- κ B-dependent genes of pro-inflammatory cytokines. In addition, the molecular mechanism for negative regulation of TLR2 expression by TGF β /Smad signalling was described in IEC. Protein expression profiling was performed in native IEC isolated from colonic tissue of wild type and IL-10^{-/-} mice after 2 and 14 weeks of monoassociation with E. faecalis. Consistent with the presence of

histopathology and persistent TLR2-mediated NF- κ B activation in IEC of IL-10^{-/-} mice, proteome analysis revealed divergent protein expression changes between WT and IL-10^{-/-} mice at early and late colonization time points. Down-regulation of important metabolic, detoxification and immunoregulatory proteins was associated with induction of endoplasmic reticulum stress (ER) in IEC of IL-10^{-/-} mice under pathologic conditions. We performed functional analysis of galectin-3 and molecular chaperone grp-78 regulated in IL-10^{-/-} mice after 14 weeks of bacterial colonization. Using specific siRNA knock-down in intestinal epithelial cell line Mode-K we investigated functions of galectin-3 and molecular chaperone grp-78 in order to explain their contribution and physiologic relevance for disease development. We described a novel molecular mechanism of ER-stress response regulation mediated by IL-10 and grp-78. Increased expression of grp-78 was found in IEC of IL-10^{-/-} mice after 14 weeks of bacterial colonization. Grp-78 gene targeting in Mode-K cell line showed that the absence of grp-78 modulated NF- κ B signalling. We presented an evidence that grp-78 is recruited to the IKK complex upon TNF-stimulation. In addition, we found that IL-10 was able to down-regulate transcriptional activity of grp-78 via the inhibition of ATF6 nuclear translocation and binding to the grp-78 promoter. Pharmacological p-38 MAPK inhibitor blocked IL-10-mediated inhibition of ATF6 recruitment to grp-78 promoter in TNF-stimulated IL-10-receptor reconstituted Mode-K cells suggesting the involvement of p-38 MAPK signalling in regulation of ER-stress response. Specific gene targeting of another protein galectin-3 in Mode-K cell line resulted in the induction of cleaved caspase-3, suggesting anti-apoptotic functions of this protein in IEC. Consistent with this finding galectin-3 down-regulation in native IEC of IL-10^{-/-}-mice correlated with increased caspase-3 expression and down-regulation of E-cadherin. Thus, protein expression profiling in native IEC revealed involvement of ER-stress, energy depletion and disturbance of mitochondrial homeostasis in the pathogenesis of experimental colitis in IL-10^{-/-} mice. Finally, we performed a pilot study with a limited number of IBD patients to apply proteome analysis in human disease. We used native IEC isolated from inflamed mucosal tissue of patients with Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). We identified Rho GDI protein to be significantly up-regulated in inflamed mucosa of CD and UC patients in comparison to control non-inflamed samples from colon carcinoma patients. We also conducted proteome analysis in inflamed versus non-inflamed mucosal tissue separately obtained from CD and UC patients. This study is aimed to identify potential protein markers involved in etiopathogenesis of human IBD.

Übersetzte Kurzfassung:

In dieser Arbeit wurden Interleukin-10 (IL-10^{-/-}) gendefiziente Mäuse als Modell für chronische Entzündungen im Darm verwendet. Wildtyp und IL-10^{-/-} Mäuse wurden mit dem colitogenen Gram-positiven Bakterienstamm *Enterococcus faecalis* monoassoziiert, um so die Bakterien-Epithelzell-Interaktionen, sowie die vom Wirt abgeleiteten Mechanismen, die an der Regulierung der chronischen Darmentzündung im genetisch empfindlichen Wirt beteiligt sind, zu charakterisieren. Zuerst wurde nachgewiesen, dass protektive Mechanismen der TGF β /Smad Signaltransduktion in Darmepithelzellen von IL-10^{-/-} Mäusen fehlen. Die Aktivierung der TGF β /Smad-Signaltransduktion führte zum Abbau des Mustererkennungsrezeptors TLR2 in Darmepithelzellen und als Folge davon wurde die Expression von NF- κ B-abhängigen pro-inflammatorischen Cytokinen im nativen Darmepithel der Wildtyp nicht aber der IL-10^{-/-} Maus gehemmt. Anschließend wurden Proteinexpressionsprofile nativer Darmepithelzellen nach 2 und 14 Wochen Kolonisierung mit *E. faecalis* von Wildtyp und IL-10^{-/-} Mäusen durchgeführt. Übereinstimmend mit dem Nachweis chronischer Entzündung im Darmgewebe und anhaltender TLR2-vermittelter NF- κ B Aktivierung in Darmepithelzellen von IL-10^{-/-}-Mäusen, zeigte die Proteomanalyse signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und IL-10^{-/-} Mäusen. Zusätzlich zur Induktion von Endoplasmatischen Reticulum (ER) Stress wurden Proteine zur Regulation metabolischer, entgiftender und immunregulatorischer Prozesse identifiziert. Galectin-3 und das Glukose-regulierte ER-Stress Protein 78 (grp-78) wurden molekular, durch die Verwendung spezifischer siRNA, auf ihre Funktion in Darmepithelzellen charakterisiert. Beide Proteine waren in IL-10^{-/-} Mäusen nach 14 Wochen Bakterienkolonisierung im nativen Darmepithel reguliert. Auf molekularer Ebene wurde ein neuer Mechanismus der Grp-78-abhängigen ER-Stress Regulierung durch IL-10 beschrieben. IL-10 hemmt die grp-78-Genexpression über die Blockierung des ATF6 Kerntransports und dessen Bindung an den grp-78 Promoter. Mittels spezifischer siRNA wurde nachgewiesen, dass IL-10 die TNF-induzierte Rekrutierung von grp-78 aus dem ER zum NF- κ B Kinase Komplex (IKK) und die NF- κ B Signaltransduktion in Darmepithelzelllinien hemmt. Der pharmakologische p38 MAPK Inhibitor verhindert die IL-10-vermittelte Hemmung der ATF6 Bindung an den grp-78 Promoter. Übereinstimmend damit wurde phospho-p38 im nativen Darmepithel von Wildtyp, nicht aber von IL-10^{-/-} Mäusen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde mittels spezifischer siRNA-Inhibierung von Galectin-3 die Aktivierung der pro-apoptotischen Caspase-3 in Darmepithelzellen nachgewiesen. Die Aktivierung der

Caspase-3 korrelierte mit der Reduktion von Galektin-3 im nativen Darmepithel von IL-10^{-/-} Mäusen. Die Proteomanalyse zusammen mit der Charakterisierung molekularer Funktionen von grp-78 und Galektin-3 geben neue Hinweise darauf, dass ER-Stress, Energieerschöpfung und Störung von mitochondrialer Homöostase in nativen Darmepithelzellen an der Krankheitsentstehung der experimentellen Colitis in IL-10^{-/-} Mäusen beteiligt sind. Anschließend wurde die Proteomanalyse zur Untersuchung chronischer Entzündungsprozesse im Darm von Patienten mit Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) durchgeführt. In dieser Pilotstudie wurden native Darmepithelzellen aus entzündetem Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) isoliert. Dabei wurde das Protein Rho GDI \blacksquare identifiziert, das in entzündetem Darmgewebe der MC und CU Patienten im Vergleich mit Kontrollproben von nicht-entzündeten Dickdarmkrebspatienten hochreguliert war. Zusätzlich wurde die Epithelzellproteomanalyse von entzündetem und nicht-entzündetem Schleimhautgewebe durchgeführt. Das Ziel dieser Studie war die Identifizierung von neuen Proteinen, die an der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt sind.

WWW:

<http://mediatum.ub.tum.de/?id=607756>

Abgegeben am:

30.08.2006

Mündliche Prüfung:

02.02.2007

Dateigröße:

5348212 bytes

Seiten:

156

Urn:

<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn:nbn:de:bvb:91-diss-20070202-607756-0-9>

Letzte Änderung:

09.03.2007

Occurrences:

- Einrichtungen > Fakultäten > Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan > Prüfungsarbeiten > Dissertationen
- Elektronische Prüfungsarbeiten > Fachgebiet > Medizin
- Elektronische Prüfungsarbeiten > Fakultät > Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
- Elektronische Prüfungsarbeiten > Fachgebiet > Biowissenschaften

Entries: