

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Lokalisation und Regulierung der Endothel-Differenzierungs-Gen-Rezeptoren
S1P₁ und LPA₁ in
humanen Myokardproben**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Weißbach

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
 2. Prof. Dr. med. Chr. Hamm
 3. Prof. Dr. med. V. Stangl

Datum der Promotion: 26. November 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Nomenklatur der Endothel-Differenzierungs-Gen-Rezeptoren.....	6
1.2 Lysophospholipide als Liganden.....	7
1.2.1 Struktur von LPA und S1P.....	8
1.2.2 Biologische Funktionen von Sphingosin-1-Phosphat.....	9
1.2.3 Biologische Funktionen von Lysophosphatidylsäure.....	10
1.2.4 Effekte von S1P ₁ und LPA ₁	10
1.3 EDG-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	11
1.3.1 Regulation von EDG-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	13
1.4 Dilatative Kardiomyopathie.....	14
1.4.1 Histologie und Pathophysiologie der DKMP.....	14
1.4.2 Diagnostik.....	15
1.4.3 Epidemiologie.....	15
1.4.4 Verlauf und Prognose.....	15
1.4.5 Ätiologie der DKMP.....	16
1.4.6 Therapie der DKMP.....	17
1.5 Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Antikörper.....	19
2.1.2 Chemikalien.....	20
2.1.3 Geräte.....	21
2.1.4 Puffer und Färbelösungen.....	22
2.1.5 Software.....	23
2.1.6 Sonstiges.....	23
2.1.7 Patientengut.....	24
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz auf Myokard Paraffinschnitten.....	27
2.2.1.1 DAPI-Färbung.....	28
2.2.1.2 Bildanalyse und Auswertung.....	28
2.2.2 Proteinextraktion aus Myokardgewebe.....	29
2.2.3 Proteinextraktion aus Zellen.....	29
2.2.4 Proteinmessung.....	30
2.2.5 Western Blot.....	31
2.2.5.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
2.2.5.2 Auftragen der Proteine.....	32
2.2.5.3 Blotting.....	32
2.2.5.4 „Coomassie Blue“-Färbung.....	33
2.2.5.5 Färbung der Nitrozellulosemembran.....	33
2.2.5.6 Antikörper-Hybridisierung.....	33
2.2.5.7 “Stripping“-Protokoll.....	34
2.2.5.8 Quantitative Auswertung.....	34
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchung.....	36

3.1.1	<i>Expressionsstärken von S1P₁ und LPA₁</i>	44
3.1.2	<i>Expression von S1P₁ und LPA₁ in Kardiomyozyten</i>	46
3.1.3	<i>Expression von S1P₁ und LPA₁ in kardialen Endothelzellen</i>	48
3.1.4	<i>Expression von S1P₁ und LPA₁ in „Vascular Smooth Muscle Cells“</i>	51
3.1.5	<i>Expression von S1P₁ und LPA₁ in Fibroblasten</i>	53
3.1.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	56
3.2	<i>Ergebnisse des Western Blots</i>	56
3.2.1	<i>Hybridisierung mit Anti-LPA₁ und Anti-GAPDH auf den Membranen 1 - 4</i>	57
3.2.2	<i>Berechnung der exprimierten Proteinmengen</i>	58
4.	<i>Diskussion</i>	61
4.1.1	<i>Nachweis von S1P₁ und LPA₁ im Myokard mittels Immunfluoreszenz</i>	61
4.1.2	<i>Quantifizierung von LPA₁-Protein im Western Blot</i>	62
4.1.3	<i>Mechanismen der Internalisierung und möglichen nukleären Translokation von Lysophospholipidrezeptoren</i>	63
4.2	<i>Funktion der Hochregulation von S1P₁ und LPA₁ bei DKMP</i>	65
4.3	<i>Ausblick</i>	66
5.	<i>Zusammenfassung</i>	68
6.	<i>Literaturverzeichnis</i>	70
	<i>Publikationen</i>	77
	<i>Lebenslauf</i>	78
	<i>Danksagung</i>	79
	<i>Erklärung</i>	80

Abkürzungsverzeichnis

Ak.....Antikörper	LPA ₁LPA-Rezeptor
ANP....."atrial natriuretic peptide"	MAP....."mitogen-activated protein"
APS.....Ammoniumpersulfat	MgCl ₂Magnesiumchlorid
BMI....."body mass index"	MnCl ₂Manganchlorid
BNP....."brain natriuretic peptide"	mRNA....."messenger-RNA"
BSA...."bovine serum albumin solution"	NGF....."nerve growth factor"
cAMP.....	PBS....."phosphate buffered saline"
.....zyklisches Adenosinmonophosphat	PCR....."polymerase chain reaction"
COX-2.....Cyclooxygenase2	PIC.....Proteinaseinhibitorcocktail
Cy3.....Indocarbocyanin	PIP2.....
DAPI.....4',6-Diamidino-2-Phenylindol	.Phosphatidinositol-(4,5)-bisphosphat
DKMP.....Dilatative Kardiomyopathie	PLC.....Phospholipase C
DMSO.....Dimethylsulfoxid	PMSF.....Phenylmethylsulfonylfluorid
DNA.....Desoxyribonukleinsäure	Raf....."Ras activated factor"
DTT.....Dithiothreitol	Ras....."rat sarcoma"
EDG.....	rKMP.....restriktive Kardiomyopathie
.....Endothel-Differenzierungs-Gen	RNA.....Ribonukleinsäure
EDTA.....Ethyldiamintetraacetat	RNAse.....Ribonuklease
eNOS....."endothelial NO synthase"	rpm....."rounds per minute"
FITC.....Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat	RT.....Raumtemperatur
GAPDH.....Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	S1P.....Sphingosin-1-Phosphat
G-Protein.....GPT-bindendes Protein	S1P ₁S1P-Rezeptor
GPCR....."G-protein-coupled-receptor"	TBS-T.....
GPT.....Guanosintriphosphat	"TRIS buffered saline TWEEN"-Puffer
HDL....."high density lipoprotein"	TRIS.....
HUVEC.....tris-(Hydroxymethyl) Aminomethan
"human umbilical vein endothelial cells"	Trk.....Tyrosinkinase
iKMP.....ischämische Kardiomyopathie	Tween.....
IP ₃Inositol-1,4,5-trisphosphatPolyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
kD.....kilo Dalton	VhSD.....Vorhofseptum-Defekt
LDL....."low density lipoprotein"	VSMC...."vascular smooth muscle cell"
LPA.....Lysophosphatidylsäure	

1. Einleitung

Die Lysophospholipide S1P und LPA üben im Herz-Kreislauf-System eine Vielzahl von Effekten aus. S1P und LPA sind Wachstumsfaktoren, die einen großen Einfluss auf Wundheilung, Thrombozytenaggregation, Angiogenese sowie die Migration von Gefäßmuskelzellen haben. Beide Lysophospholipide sind auch an entzündlichen Prozessen sowie bei der Entstehung von Hypertrophie der Herzmuskelzellen beteiligt. Die LPA- und S1P-abhängige Signaltransduktion wird überwiegend über acht G-Proteingekoppelte Rezeptoren der EDG-Familie vermittelt. Die zelluläre Expression von GPCRs wird auf verschiedene Art und Weise reguliert. Diese Prozesse stehen im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen von Herzmuskelzellen bei DKMP, welche in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

1.1 Nomenklatur der Endothel-Differenzierungs-Gen-Rezeptoren

Die EDG-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und weisen den typischen Aufbau mit sieben transmembranen Domänen auf, wobei der N-Terminus nach außen und der C-Terminus ins Zellinnere gerichtet ist [1]. Der Name „EDG“ wurde 1990 von Hla und Maciag verwendet, um eine Reihe von unmittelbar früh antwortenden Genprodukten, kloniert aus HUVECs, zu beschreiben [2]. EDG1 wurde als erster Rezeptor der Familie benannt und der Rhodopsin-Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren zugeordnet [3]. 1995 wurde EDG2 entdeckt, dessen Struktur nur teilweise mit der des EDG1-Rezeptors übereinstimmt [4]. Weitere fünf Mitglieder der EDG-Familie wurden dann in der Reihenfolge ihres Auftretens nummeriert. Die LPA-Affinität des EDG2-Rezeptors wurde 1996 entdeckt [5]. 1997 wurde die Erkenntnis ergänzt, dass EDG1 und EDG3 S1P-präferierende Rezeptoren sind [6-8].

Heute sind acht EDG-Rezeptoren bekannt, die laut „International Union of Pharmacology XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature“ (IUPHAR) nach ihren Liganden Lysophosphatidylsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) unterschieden werden [2]. In dieser Arbeit wird die aktuelle IUPHAR Nomenklatur verwendet.

Ligand	IUPHAR Nomenklatur	EDG Nomenklatur
LPA	LPA₁	EDG2
LPA	LPA₂	EDG4
LPA	LPA₃	EDG7
S1P	S1P₁	EDG1
S1P	S1P₂	EDG5
S1P	S1P₃	EDG3
S1P	S1P₄	EDG6
S1P	S1P₅	EDG8

Tabelle 1: Nomenklatur der EDG-Rezeptoren

1.2 Lysophospholipide als Liganden

Lysophospholipide entstehen als Vorstufen und Metaboliten während der de-novo-Synthese von Phospholipiden. Außerdem werden sie in enzymatischen Reaktionen nach entsprechender Stimulation der Zellen aus Vorläufermolekülen freigesetzt. Glycerophospholipide sind dabei Vorläufer von Lysophosphatidylsäure (LPA) und Sphingolipide die Vorläufer des Sphingosin-1-Phosphats (S1P) [9].

LPA und S1P wirken im Körper als Signalmoleküle, die auf ihre Zielzellen eine Vielzahl von Effekten ausüben. Das schließt unter anderem die Blutdruckregulation, Kontraktion glatter Muskelzellen, Thrombozytenaktivierung sowie wachstumsregulierende Eigenschaften auf Zellen ein [10-13]. Zur Signaltransduktion binden die Liganden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der EDG-Familie. S1P bindet mit hoher Affinität an S1P₁ und LPA an LPA₁. Sie wirken jedoch auch selbst als intrazelluläre „second messenger“, wobei keine Bindung an einen Rezeptor erforderlich ist [14]. S1P und LPA binden mit niedrigerer Affinität jeweils auch an den anderen Rezeptor. Als gebundene G-Proteine sind G_q, G_{i/o} und G_{12/13} bekannt [14]. Lysophospholipide gehören im menschlichen Körper zu den am stärksten pleiotropen Molekülen mit großer Bedeutung in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen auch im kardiovaskulären System [15]. Beide Liganden können direkt auf die Physiologie der Kardiomyozyten Einfluss nehmen, z.B. durch Protektion der Myozyten während ischämischer Zustände, jedoch auch durch Hypertrophie auslösende Signaltransduktion [16].

Beide Mediatoren werden überwiegend von Thrombozyten, aber auch von Fibroblasten und Leukozyten ins Blut abgegeben [17, 18], welche sie wiederum aktivieren können,

wobei LPA ein größeres Potential aufweist als S1P [19]. Es ist davon auszugehen, dass bei thromboembolischen Ereignissen lokal hohe Spiegel von LPA und S1P erreicht werden. LPA und S1P beeinflussen außerdem die Kontraktion der glatten Muskelzellen [7] und die Chemotaxis [18].

1.2.1 Struktur von LPA und S1P

Abbildung 1 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit von S1P und LPA. S1P besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, dessen freie OH-Gruppe mit Phosphorsäure verestert ist [20]. LPA besteht aus einem LPA-Rückgrat mit einer Phosphatgruppe an Position sn-3, einer Hydroxylgruppe an sn-2 oder sn-1 sowie einer Fettsäurekette an Position an sn-1 oder sn-2. Die Fettsäure ist ein langkettiges, gesättigtes oder ungesättigtes Fettsäuremolekül, welches über eine Alkylgruppe mit dem Glycerin verbunden ist [21].

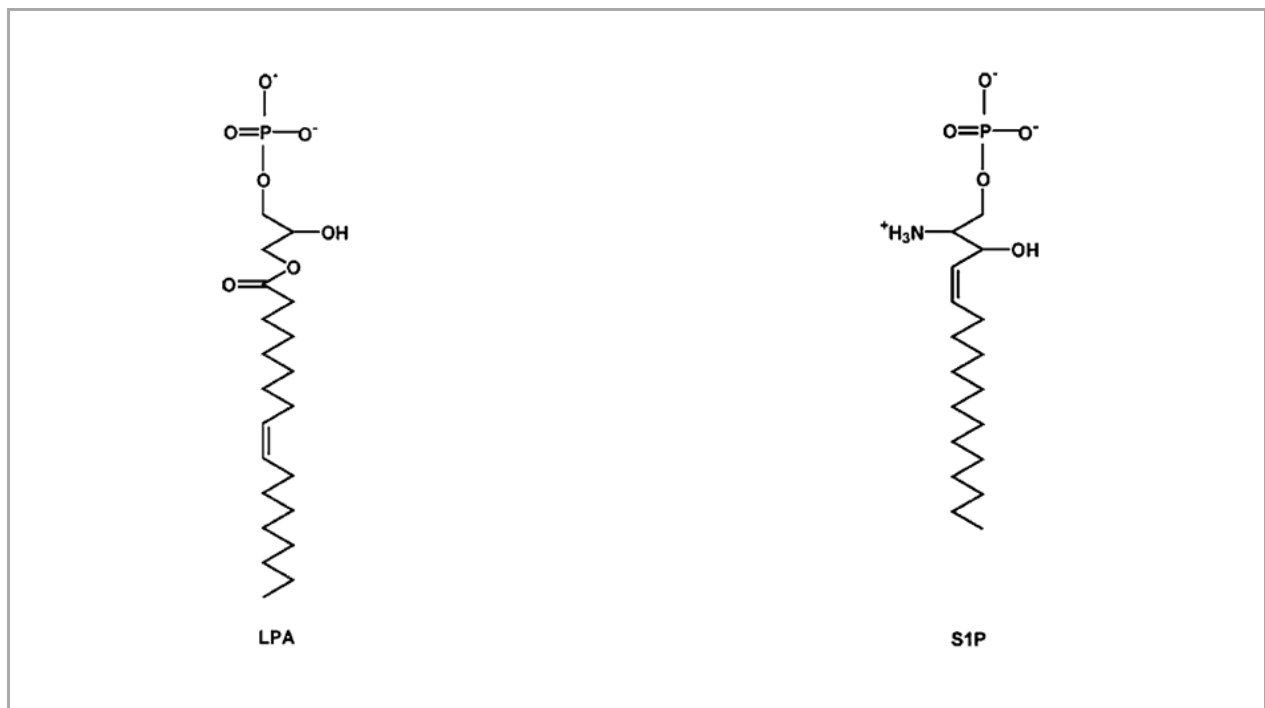


Abbildung 1: Lysophosphatidylsäure und Sphingosin-1-Phosphat (nach Ishii I, Fukushima N, Annu. Rev. Biochem. 2004)

1.2.2 Biologische Funktionen von Sphingosin-1-Phosphat

Der extrazelluläre S1P-Pool stammt überwiegend aus aktivierten Thrombozyten, was auf die Anwesenheit der Sphingosin-Kinase und das Fehlen der Sphingosin-Phosphatase in Thrombozyten zurückzuführen ist [22, 23]. LDL ist ebenfalls ein Träger von S1P, wenn auch in wesentlich geringerem Umfang. Die normale Plasmakonzentration liegt bei 50 bis 400 nM [24].

S1P besitzt diverse biologische Funktionen bei denen es als intrazellulärer „second messenger“ agiert und die Zellproliferation und das Zellüberleben fördert. Die Signalkaskaden des extrazellulären S1P sind mit vielen biologischen Prozessen verbunden, die im Zusammenhang mit der Angiogenese stehen [25]. Das beinhaltet die Fähigkeit zur Stimulation von Zell-Migration und Zell-Motilität [26], Proliferation, Chemotaxis, Expression von Adhäsionsmolekülen und Ausbildung eines kapillären Netzwerkes während der Morphogenese [27]. Weiterhin zeigen S1P-defiziente Mäuse einen Mangel an glatten Gefäßmuskelzellen. Adhäsion und Migration von Endothelzellen während der Angiogenese sind bei diesen Tieren ebenfalls gestört [28]. Weitere Einflussbereiche des S1P, die im Zusammenhang mit Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stehen stellen die Thrombozyten-Aggregation [10], die Expression von Adhäsionsmolekülen und in der ansteigenden Permeabilität der „tight junctions“ von Endothelzellen dar [29].

S1P ist an Prozessen der Apoptose, der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung [14, 30-32] und der Myozyten-Hypertrophie in vitro beteiligt. S1P schützt Endothelzellen vor der Apoptose durch eNOS-Aktivierung und Gi-vermittelte PLC-Signaltransduktionswege [33] sowie Myozyten vor Hypoxie-induziertem Zelltod [34], ist also in der Lage, Infarktgebiete in ihrer Ausdehnung zu reduzieren. In Rattenmyozyten kann durch S1P Hypertrophie induziert werden [35]. Als Vasokonstriktor in mesenterialen und intrarenalen Gefäßen der Ratte hat S1P in vitro auch vasoaktive Wirkung [36].

Schon während der embryonalen Entwicklung des Herzens spielt S1P eine Rolle, worauf die starke Expression von S1P₁-Genen in neonatalen Myozyten hinweist [37]. Weiter scheint S1P eine direkte antiadrenerge Wirkung auf das humane Myokard zu besitzen und hat damit pathophysiologische Bedeutung in Ischämie und endzündlichen Vorgängen des Myokards [34, 38]. Auf mRNA-Ebene wurde S1P₁ in adultem und fetalem humanen Myokard sowie in Endothelzellen kardialer Gefäße nachgewiesen. Durch Western Blots wurde das Ergebnis auf Protein-Ebene bestätigt [39].

1.2.3 Biologische Funktionen von Lysophosphatidylsäure

LPA ist ein Glycerophospholipid-Mediator mit diversen biologischen Funktionen, welcher von aktivierten Thrombozyten, Fibroblasten und Leukozyten ausgeschüttet wird [9]. Die Konzentration liegt in humanem Blutserum zwischen 1 und 5 μM , wobei LPA an Albumin, LDL und andere Proteine gebunden vorliegt [40].

Die Kontraktion glatter Muskelzellen [41], Blutdruckregulation und Thrombozyten-Aktivierung [42] werden durch LPA beeinflusst. Die vasoaktive Wirkung von LPA ist schon seit den 70er Jahren bekannt. Danach verursacht die intravenöse Injektion von LPA Bluthochdruck bei Ratten und Meerschweinchen, jedoch Hypotonie bei Katzen und Kaninchen [12]. Neuere Forschungsergebnisse dazu zeigten, dass LPA in vivo vasospastisch auf cerebrale Gefäße wirkt [43] und die Endothelin-1-vermittelte Vasokonstriktion verstärkt [44]. LPA ist während der primären Blutgerinnung möglicherweise am posthämorrhagischen Vasospasmus beteiligt. Eine Ausschüttung von Lysophospholipiden durch aktivierte Thrombozyten z.B. während eines Koronararterienverschlusses mit myokardialer Ischämie kann also eine weitere Thrombozytenaggregation hervorrufen. LPA hat Wachstumsfaktor-ähnliche Funktionen in nahezu allen Zelltypen und spielt damit auch in der malignen Entartung von Zellen eine Rolle. LPA wirkt in humanen Myozyten antiadrenerg, indem es über den Rezeptor LPA_1 die Adenylatcyclase-Aktivität inhibiert und zu einer Verminderung der Kontraktilität führt [45]. Da hohe LPA-Spiegel vor allem in Gegenwart von aktivierten Thrombozyten und Lymphozyten erreicht werden, nimmt man an, dass LPA in hypoxischem und entzündlich verändertem Myokard antiadrenerge und damit kardioprotektive Wirkung zeigt, da der Sauerstoffverbrauch der Myozyten gesenkt wird. In isolierten Rattenmyozyten wurde ein verbessertes Zellüberleben bei hypoxischen Zuständen durch LPA gezeigt [34]. Gleichzeitig wird jedoch durch die Thrombozytenaktivierung die Gerinnung weiter gefördert. LPA akkumuliert in artherosklerotischen Plaques als Hauptkomponente des lipidhaltigen Kerns und fördert bei deren Ruptur ebenfalls die Entstehung von Thromben [46]. Zudem ist LPA in der Lage die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen zu fördern, was zur Pathogenese der Artherosklerose gehört [34].

1.2.4 Effekte von S1P_1 und LPA_1

An Endothelzellen der Rinder-Aorta und in HUVECs, welche S1P_1 und LPA_1 exprimieren, wurde durch in-vitro-Wundheilungsversuche gezeigt, dass der Verschluss der verletzten Endothelzellschicht durch LPA und S1P stimuliert wird [47]. Die zwei Hauptkom-

ponenten der Wundheilung, Zellmigration und Proliferation, werden durch die beiden Lysophospholipide S1P und LPA stimuliert [48], wobei S1P₁ und LPA₁ als Vermittler dieser Signaltransduktion in Frage kommen. Diese Mechanismen könnten sowohl positive als auch negative Effekte auf Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems haben, da sie zum einen die Wundheilung der Endothelzellen und zum anderen die Migration und Proliferation von Gefäßmuskelzellen in die Intima fördern können. Es wurde zudem gezeigt, dass die durch HDL stimulierte Zellmigration und das stimulierte Zellüberleben durch Inhibierung von S1P₁ mittels Antisense-Oligonukleotiden stark herunterreguliert wird [49].

1.3 EDG-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

GPCRs antworten auf chemische oder sensorische Reize wie Hormone, Neurotransmitter oder Licht [50]. GPCRs wandeln die Information, die über diese Stimuli geliefert werden um und geben sie an intrazelluläre „second messenger“ weiter, die für das jeweilige Signal eine spezifischen Signal-Kaskaden auslösen [51]. Die schnelle Signalweiterleitung erfolgt durch Anlagerung des extrazellulären Agonisten an den Rezeptor, woraufhin das G-Protein durch Phosphorylierung in seine Untereinheiten zerfällt. Dadurch wird es aktiviert und die Signal-Kaskade wird eingeleitet.

Die beschriebenen Effekte der Lysophospholipide werden vor allem durch Bindung an EDG-Rezeptoren vermittelt. Die S1P- und LPA-Rezeptoren, die die EDG-Familie bilden, sind in ihrer Aminosäure-Sequenz nur zu 35% identisch. Der Unterschied liegt in der Präsenz eines Introns auf dem Genabschnitt, der die sechste Transmembrandomäne dieser Rezeptoren kodiert [52].

Die ubiquitäre Expression der EDG-Rezeptoren in allen Organsystemen und ihre pleiotropen biologischen Effekte lassen einen großen Einfluss auf physiologische Funktionen im gesamten Organismus vermuten.

Die mRNA-Expression des Rezeptors LPA₁ ist in zahlreichen Geweben nachgewiesen, darunter im Herzen, im Gehirn, im Dickdarm, im Dünndarm und in der Prostata. Keinen Nachweis für ein Vorhandensein der LPA₁-mRNA konnte in der Leber, in der Lunge, im Thymus und in den Leukozyten erbracht werden [53]. Im Gegensatz zu LPA₁ ist S1P₁ ubiquitär vorzufinden und zeigt damit eine geringere gewebsspezifische Expression [54].

Die EDG-Rezeptoren sind an G-Proteine aus der Familie der G_{i/o}⁻, G_q⁻, oder G_{12/13}⁻ Proteine gekoppelt, denen unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege

nachgeschaltet sind. Über die α -Untereinheit von G_i -Proteinen wird zum Beispiel die LPA- und S1P-induzierte Hemmung der Adenylatcyclase vermittelt, was zur Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration führt. Über die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G_i -Proteine wird ein Signaltransduktionsweg aktiviert, der für die proliferationsfördernden Eigenschaften von LPA und S1P von Bedeutung ist. Hierbei kommt es zu einer Aktivitätssteigerung einer Protein-Tyrosin-Kinase, der Aktivierung des kleinen monomeren G-Proteins Ras, dann zur Bindung von Ras an eine Proteinkinase aus der Raf-Familie und schließlich zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade [55]. MAP-Kinasen sind ubiquitäre Serin/Threonin-Kinasen, die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung regulieren [56-60].

LPA- und S1P-aktivierbare EDG-Rezeptoren und ihre gebundenen G_i -oder G_q -Proteine beeinflussen weitere Signalwege, welche die Zellproliferation regulieren. Hierbei ist die PLC zwischengeschaltet, welche zur Bildung von Diacylglycerin und IP_3 führt. Diacylglycerin führt über die Aktivierung einer Proteinkinase C zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade. IP_3 vermittelt die Mobilisierung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern, was für verschiedene Prozesse wie Kontraktion, Genexpression, Sekretion und Zelldifferenzierung bedeutsam ist [9, 61-63].

Über $G_{12/13}$ -Proteine werden Rho-abhängige Signaltransduktionswege ausgelöst, wozu die Aktivierung der Phospholipase D, der Phosphatidylinositol-3-Kinase und Veränderungen des Zytoskeletts wie Zellabrundung, Stressfaserbildung und Zellaggregation gehören [48, 64-68].

Neben der intrazellulären Signaltransduktion durch S1P als „second messenger“ [23] existiert die S1P-Rezeptor-abhängige Signalvermittlung. Diese kann über die extrazellulär Signal-reduzierte Kinase (ERK) verlaufen, was zur Zellproliferation führt, über die Adhäsions-Kinase FAK, was die Migration glatter Gefäßmuskelzellen fördert sowie über den „nuclear factor-kappa B“, was die Expression von Adhäsions-Molekülen an glatten Gefäßmuskelzellen zur Folge hat [69].

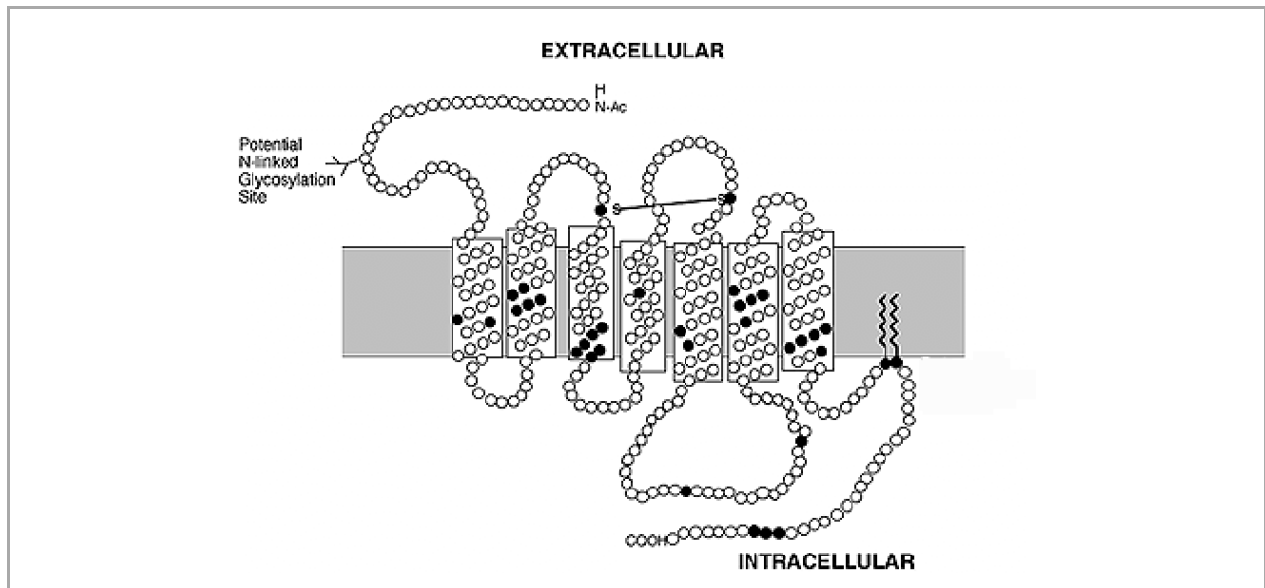


Abbildung 2: Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit 7 transmembranären Domänen. Der N-Terminus ist nach außen, der C-Terminus intrazellulär ausgerichtet.

(nach <http://www.cis.upenn.edu/~krice/snake.gif>)

1.3.1 Regulation von EDG-Rezeptoren als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Tiermodellen lassen vermuten, dass die im menschlichen Herzen exprimierten $S1P_1$ - und LPA_1 -Rezeptoren im Verlauf von Kardiomyopathien reguliert werden [35, 70]. Die Regulation von Rezeptoren ist ein Mechanismus der Zelle, um ihre Empfindlichkeit gegenüber einem Liganden zu steuern. Mit der Hochregulation eines Rezeptors auf der Plasmamembran wird die Sensitivität der Zelle erhöht, da extrazelluläre Liganden an Rezeptoren binden und so eine intrazelluläre Signaltransduktion ausgelöst werden kann. Wird die Rezeptor-Dichte auf der Zellmembran herunterreguliert, können weniger extrazelluläre Liganden an den passenden Rezeptor binden und es folgt eine Signal-Abschwächung. Eine Form der Regulation stellt die Internalisierung von Rezeptoren durch Endozytose dar. Der Arrestin-gebundene Rezeptor bindet an membrangebundenes Clathrin und wird Dynamin-vermittelt in Endosomen eingelagert. Der Rezeptor kann nach Dephosphorylierung über "recyclingde" Endosomen wieder in die Plasmamembran eingefügt oder im phosphorylierten Zustand in Proteasomen verdaut werden [71]. Man nimmt an, dass die Rezeptoren durch Endozytose in die Nähe von Endosomen-assoziierten Phosphatasen gebracht werden. Durch die vorhergehende Phosphorylierung an der Oberfläche wird die Internalisierung wieder aufgehoben [72, 73]. Kommt es zum proteolytischen Abbau, verläuft dieser wahrscheinlich Endosomen-vermittelt, indem die Endosomen die phosphorylierten Rezeptoren an Lysosomen übertragen und deren

Proteasen den Verdau vornehmen [74, 75]. Es existieren anscheinend verschiedene biochemische Mechanismen, welche die post-endozytotische Sortierung der Rezeptoren vornehmen [71].

Eine schnelle Desensibilisierung erfolgt durch die GPCR-Kinase K, welche die Phosphorylierung des Rezeptors fördert, gefolgt von der Rekrutierung von Arrestin, welches die Aktivierung von G-Proteinen verhindert.

Die Lokalisation von LPA₁ wurde auf der Membran gezeigt sowie aufgrund von endozytotischen Vorgängen im Zytoplasma [76]. Von Gobeil et al. durchgeführte Versuche mit mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Schweinegehirn und mit LPA₁-transfizierten HTC4-Zellen (Ratten-Tumorzellen), weisen darauf hin, dass LPA₁ in diesen Zellen auch im Kern vorzufinden ist. Der Großteil der LPA₁-Rezeptoren wurde in dieser Studie allerdings perinukleär lokalisiert. Die Ergebnisse wurden mit Zellfraktionierungsmethoden und mittels Western Blot ermittelt [77]. In Immunfluoreszenzuntersuchungen von Moughal et al. wurde ebenfalls LPA₁ im Zellkern nachgewiesen. Hierbei wurden LPA₁-überexprimierende PC12-Zellen (Ratten-Tumorzellen) verwendet, die unter LPA-Stimulation eine Rezeptor-Translokation in den Zellkern zeigten [78]. Es konnte also zweimal unabhängig voneinander eine Kernlokalisierung von LPA₁ festgestellt werden. Diese Kernlokalisierung wurde allerdings zum einen in unterschiedlichen Zelltypen und zum anderen bei den Untersuchungen von Moughal [78] an stimulierten Zellen und bei Gobeil et al. [77] an unstimulierten Zellen festgestellt.

1.4 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie geht mit einer Erweiterung des linken und/oder rechten Ventrikels einher, wobei die Wanddicke der Ventrikel sowie die Koronargefäße unverändert bleiben. Die systolische Pumpfunktion des Herzens ist eingeschränkt, was sich in einer verminderten Ejektionsfraktion äußert [79].

1.4.1 Histologie und Pathophysiologie der DKMP

Charakteristisch für das morphologische Korrelat der DKMP sind das gleichzeitige Vorkommen von physiologisch erscheinenden, gering bis hochgradig pathologisch veränderten Kardiomyozyten sowie komplett degenerativ zerstörten Arealen. Entzündliche Veränderungen und eine unterschiedlich stark ausgeprägte interstitielle Fibrose sind meistens nachweisbar. Die verbliebenen Kardiomyozyten weisen teils vergrößerte, kastenförmig veränderte Zellkerne und eine nicht-funktionelle Hypertrophie auf. Häufig beste-

hen auch größere Kaliberunterschiede. Ein Verlust von mehr als 40% der Kardiomyozyten gilt als nicht mehr mit dem Leben vereinbar [80].

Die Symptome entsprechen klinisch denen der Herzinsuffizienz, d.h. Abgeschlagenheit, Müdigkeit und Atemnot. Thromboembolische Ereignisse, ventrikuläre Tachykardien, AV-Überleitungsstörungen und plötzlicher Herztod können in jedem Stadium der Erkrankung auftreten.

Die Müdigkeit entsteht dabei durch eine Reduktion des Herzminutenvolumens und der daraus resultierenden Minderversorgung der Skelettmuskulatur. Die Dyspnoe korreliert mit dem linksventrikulären Füllungsdruck. Die Erhöhung des pulmonalvenösen Druckes führt dabei zu einer Versteifung des Lungengewebes mit erhöhter Atemarbeit [81].

1.4.2 Diagnostik

Zur Diagnostik wird eine Echokardiographie oder eine Magnetresonanztomographie durchgeführt, in der sich die Ventrikel dilatiert darstellen. Gesichert wird die Diagnose durch eine Herzmuskelbiopsie, welche die typischen morphologischen Veränderungen zeigt.

1.4.3 Epidemiologie

Die Inzidenz der DKMP liegt bei 6 pro 100.000 Einwohner, die Prävalenz bei 36 Patienten auf 100.000 Einwohner. Damit stellt sie als häufigste Herzmuskelerkrankung die Hauptindikation zur Herztransplantation dar. Männer sind mit einem Verhältnis von 2:1 gegenüber Frauen häufiger betroffen. Die Krankheit kann sich in jedem Lebensalter manifestieren [82].

1.4.4 Verlauf und Prognose

Der Verlauf der dilatativen Kardiomyopathie ist variabel, oft zeigt sich jedoch eine kontinuierliche Verschlechterung. Klinisch stabile Phasen oder spontane Remissionen sind äußerst selten [82]. Die 1-Jahres-Überlebensrate liegt bei 67 %, die 10-Jahres-Überlebensrate bei 30 %. Todesursache der Patienten sind meist eine progrediente, therapierefraktäre Herzinsuffizienz oder ventrikuläre Herzrhythmusstörungen, wobei in 20–30 % der Fälle ein plötzlicher Herztod beobachtet wird [83]. Der Grad der systolischen Funktionseinschränkung ist ein prognostischer Parameter, wobei vor allem die Ejektionsfraktion zum Zeitpunkt der Diagnosestellung relevant ist. Eine erhöhte Plasmakonzentration von Noradrenalin, Renin, Aldosteron oder Angiotensin-

konvertierendem-Enzym scheint mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium einherzugehen [84, 85]. Weitere prognostische Faktoren der Mortalität und Morbidität der begleitenden Herzinsuffizienz stellen die Konzentrationen des „atrial natriuretic peptides“ und vor allem des „brain natriuretic peptides“ dar [86, 87]. Einen hohen Stellenwert zur Einschätzung des Krankheitsstadiums haben außerdem hämodynamische Parameter, wie ein erhöhter pulmonalkapillärer Verschlussdruck, eine Erhöhung des zentral venösen Drucks, eine systolische Hypotension sowie eine pulmonale Hypertonie.

1.4.5 Ätiologie der DKMP

Es wird vermutet, dass genetische, virologische, immunologische und metabolische Faktoren bei der Entstehung der DKMP eine Rolle spielen.

Je nach Literaturquelle weisen 5-20 % der Erkrankten eine positive Familienanamnese auf [88], wobei bisher vier Erbgänge bekannt sind. Die Mehrzahl der Fälle wird demnach autosomal-dominant vererbt. Bisher konnten sechs DKMP-assoziierte Genorte identifiziert werden [89]. Selten sind X-chromosomal-rezessive Formen, die mit einer Mutation im Dystrophin-Gen einhergehen. Extrem selten liegt ein autosomal-rezessiver Erbgang zugrunde, welcher vorzugsweise im frühen Kindesalter beobachtet wird sowie ebenfalls extrem selten Mutationen des mitochondrialen Genoms.

Weiter wird eine inflammatorische Genese der DKMP diskutiert [90, 91]. Bestimmte Formen der DKMP könnten demnach eine chronische Variante der viralen Myokarditis darstellen. Hierfür spräche zum Beispiel der Nachweis von persistierenden Viren sowie seltener von Bakterien und Parasiten im Myokard von DKMP-Patienten. Dabei wurden neben Coxsackie-Viren vor allem DNA-Viren wie das Zytomegalievirus, Adenoviren, das Epstein-Barr-Virus und RNA-Viren isoliert. Selten finden sich Bakterien (*B. burgdorferi*, *C. diphtheriae*) und Parasiten (*Trypanosoma cruzi*, Askarien) [92, 93].

Neben einer direkten Schädigung der myokardialen Strukturen durch Infektions- oder Entzündungs-Reaktionen wird dabei auch die Induktion autoimmunologischer Prozesse diskutiert. Über die Freisetzung und Präsentation intrakardialer Antigene könnte es zu einer Triggerung autoimmunologischer Prozesse kommen [94].

In Studien konnten außerdem erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden, die vermutlich für die DKMP von Bedeutung sind [95-97]. Hauptsächlich sind Veränderungen von Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interleukin-6 beschrieben worden. Diese Immunmodulatoren können kardiovaskuläre Funktionen durch verschiedene Mechanismen beeinflussen. So können zum Beispiel myokardiale

Dysfunktionen induziert [34, 98-100] und ventrikuläres Remodelling begünstigt werden [101].

1.4.6 Therapie der DKMP

Für DKMP-Patienten sind eine Normalisierung des Körpergewichtes sowie leichte körperliche Betätigung anzustreben, um die Belastungstoleranz zu erhöhen [102]. Als medikamentöse Therapie steht die Behandlung der Herzinsuffizienz im Vordergrund, wobei eine Kombinationstherapie unter Verwendung von ACE-Hemmern und β -Rezeptoren-Blockern erfolgen sollte, die je nach Schweregrad der DKMP durch andere Substanzen ergänzt wird. Zur Therapie von Herzrhythmusstörungen können die Implantation eines automatischen Defibrillators sowie eine orale Therapie mit Antikoagulanzen notwendig werden. Bei fehlendem Ansprechen der Therapie ist eine Herztransplantation in Betracht zu ziehen. Von den transplantierten Patienten überleben etwa 80% die ersten 5 Jahre [103].

1.5 Fragestellung

S1P₁ und LPA₁ werden im Herz-Kreislauf-System des Menschen exprimiert [39, 104]. Die LPA₁- und S1P₁-vermittelten Effekte beinhalten unter anderem die Regulation von Zellhypertrophie, inflammatorischen Prozessen, Proliferation und Apoptose sowie Immunmodulation. Diese Prozesse spielen für die morphologischen Veränderungen des Myokards bei DKMP eine übergeordnete Rolle: So zeigt sich das Myokard pathologisch verändert durch hypertrophe Kardiomyozyten, entzündliche Veränderungen und interstielle Fibrose. Dabei kommen sowohl eine Schädigung der myokardialen Strukturen durch Infektions-Reaktionen als auch autoimmunologische Prozesse in Frage. Es werden Immunmodulatoren beschrieben, welche myokardiale Dysfunktionen induzieren und ventrikuläres „remodelling“ begünstigen.

Über LPA₁ und S1P₁ können diverse Effekte auf Zielzellen im Myokard ausgeübt werden, welche im Zusammenhang mit der Entstehung der DKMP stehen, wobei die Sensitivität dieser Zielzellen durch Regulation des Rezeptors verändert werden kann. In der Literatur wird für beide Rezeptoren die agonistenabhängige Endozytose im Sinne einer Regulation beschrieben.

Ziel dieser Studie ist es darzustellen, welche Zellen im humanen Herzen LPA₁ und S1P₁ exprimieren und so als Zielzellen der Signaltransduktion in Frage kommen. Des Weiteren

ren soll die Regulation als Änderung der Expressionsstärke beider EDG-Rezeptoren in gesunden Herzen und Herzen von DKMP-Patienten verglichen werden.

Grundlage dafür ist der Vergleich linksventrikulärer Myokardproben von Patienten mit DKMP mit denen von gesunden Organspendern hinsichtlich möglicher Unterschiede in der EDG-Expression. Die Lokalisation und Expressionsstärke der beiden untersuchten EDG-Rezeptoren wird dabei durch Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, die Expression von LPA₁ zusätzlich mittels Western-Blot-Analysen zur Quantifizierung des Proteins. Die Western-Blot-Daten zur Quantifizierung des S1P₁-Proteins in humanem Myokard liegen der Arbeitsgruppe bereits vor (siehe Publikationen Becher et al.).

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im Materialteil werden alle verwendeten Chemikalien, Biochemikalien, Materialien und Geräte, ihre Bezugsquellen und die verwendeten Proben aufgelistet, die in dieser Arbeit zum Einsatz kamen.

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Antikörper Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Europe, Cambridgeshire, Großbritannien
Antikörper gegen Alpha Smooth-Muscle-Actin (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Antikörper gegen CD68 (monoklonal)	Diagnostic BioSystems, Pleasanton, USA
Antikörper gegen LPA ₁ , C-terminal (monoklonal)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Antikörper gegen LPA ₁ , N-terminal (monoklonal)	Abgent, San Diego, USA
Antikörper gegen S1P ₁ (monoklonal)	Exalpa Biologicals, Maynard, USA
Antikörper gegen Vimentin	Oncogene Research Products, Merck, Darmstadt, Deutschland
Antikörper gegen Von-Willebrandt-Faktor (monoklonal)	Dianova, Hamburg, Deutschland
Antikörper Indocarbocyanin (Cy3)-gekoppelt	Jackson ImmunoResearch Europe, Cambridgeshire, Großbritannien
Blocking-Peptid (LPA ₁ C-Terminus)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Rabbit IgG	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Tabelle 3: Antikörper

2.1.2 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Ammoniumperoxidsulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Blot-Quickblocker	Chemicon International, Temecula, USA
Bovine Serum Albumin Solution 35% Citrat (C ₆ H ₈ O ₇)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (CH ₄ O)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS-Tablets	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
Ponceau Solution 0,1%	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Prestained Protein Ladder	Fermentas, Hanover, USA
Roticlear	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Rotiload	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

SDS (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Sudan Black B	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield Mounting Medium For Fluorescence	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien und Biochemikalien

2.1.3 Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Blotkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kanada
Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Biosciences, Großbritannien
Fast Prep FP 120	Bio 101 Thermo Savant
Galaxy Mini Zentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
IKA Vibrax VXR	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
Mini Oven	MWG Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland
Test Tube Thermostat TCR 100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Waage	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
Magnetrührer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Brutschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Schneidegerät	Microm International GmbH, Deutschland

Tabelle 5: Geräte

2.1.4 Puffer und Färbelösungen

Puffer	Rezept
Citratpuffer 10 mM	1,92 g Citrat in 1l H ₂ O lösen und auf pH 6 einstellen.
Coomassie Blue	2,5 g Coomassie Brilliant Blue 450 ml Methanol 450 ml H ₂ O 100 ml Eisessig
Elektrophoresepuffer (5 x)	15,1 g TRIS Base 94,0 g Glycin 50 ml 10% SDS mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen und auf pH 8,3 einstellen.
Glycine Stripping Buffer	7,5 g Glycin in 300 ml Millipore H ₂ O 5 ml 10% SDS 5 ml Tween 20 auf pH 2,2 einstellen und auf 500 ml H ₂ O auffüllen.
PBS-T 10 mM (Phosphate buffered Saline TWEEN Puffer)	1 PBS-Tablette in 1000 ml H ₂ O auflösen und mit 0,5% TWEEN 20 versetzen.
PBS-T-BSA	5% bovines Serumalbumin (35%) in PBS-T lösen.
Protein-Extraktionspuffer (Double Detergent Lysis Buffer)	1,0 ml 1M Trispuffer (pH 7,5) 2,8 ml 5M NaCl 200 µl 0,5M EDTA 25 ml 100% Glycerol mit Millipore H ₂ O auf 100 ml auffüllen

	Pro ml fertigem Puffer werden direkt vor Gebrauch zugesetzt:
	1 µl 1M DTT
	10 µl 50mM PMSF
	2,5 µl Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin)
TBS-T (5 x) (Tris buffered Saline TWEEN Puffer)	12,1 g TRIS Base 40 g NaCl mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen und auf pH 7,6 einstellen. Gebrauchsfertigen Puffer mit 0,1% TWEEN 20 versetzen.
TBS-T-BSA Transferpuffer (4 x)	0,5 % bovines Serumalbumin (35 %) in TBS-T lösen 14,415 g Glycin 3,03 g TRIS Base mit H ₂ O auf 800 ml auffüllen und auf pH 8,3 einstellen. Gebrauchsfertigen Puffer 4+1 mit Methanol versetzen.

Tabelle 6: Puffer

2.1.5 Software

Programm	Bezugsquelle
Photoshop 7.0	Adobe
Alpha Ease	Alpha Innotech
Sigma Plot 8.0	Systat Software Inc.
SPSS 11.5	SPSS
Endnote 9.0	Thomson ResearchSoft
OpenLab 3.1	Leica

Tabelle 7: Software

2.1.6 Sonstiges

Sonstiges	Bezugsquelle
Kodak Light Film	Kodak Industrie, Frankreich
Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien
Fotochemikalien	AGFA AG, Leverkusen Deutschland

Tabelle 8: Sonstiges

2.1.7 Patientengut

Es wurden insgesamt 20 humane Myokardproben für die Immunhistologie verwendet, die alle aus dem linken Ventrikel stammten. Die Proben wurden Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet. Sie werden in Tabelle 9 aufgeführt unter Angabe von Diagnose, Geschlechts, Alter, Blutdruck sowie der NYHA-Klassifikation und BMI, soweit vorhanden. Die Kontrollen tragen die Bezeichnungen k1 bis k10, die Patienten p1 bis p10.

Bezeichnung	Diagnose	Geschlecht	Alter	Blutdruck	NYHA	BMI in kg/m ²
k1	Spender	weiblich	53	120/80		20,1
k2	Spender	weiblich	53	120/80		
k3	Spender	weiblich	52	120/80		21,0
k4	Spender	weiblich	37	107/78		
k5	Spender	weiblich	18			21,2
k6	Spender	weiblich	64	120/80		17,3
k7	Spender	männlich	58	120/60		25,9
k8	Spender	männlich	55			22,0
k9	Spender	männlich	44	110/60		24,8
k10	Spender	männlich	21			
p1	DKMP	weiblich	12	112/65	III	13,3
p2	DKMP	weiblich	65	100/60	IV	20,3
p3	VhSD	weiblich	34			
p4	ikmp	weiblich	60			
p5	rkmp	weiblich	40			
p6	DKMP	männlich	49	130/70	IV	20,3
p7	DKMP	männlich	33	120/60	IV	16,0
p8	DKMP	männlich	59		IV	25,4
p9	DKMP	männlich	52	150/95	III	26,5
p10	DKMP	männlich	43	120/80	III	32,4

Tabelle 9: Zusammenstellung der verwendeten Proben in der Immunhistologie. Spender: mittleres Alter 45,5 Jahre, Standardabw. 15,5 Jahre. 60% weiblich, 40% männlich. Patienten: mittleres Alter 44,7 Jahre, Standardabw. 15,9 Jahre. 50% weiblich, 50% männlich.

Für die Western Blots wurden Proteine aus 36 humanen linksventrikulären Myokardproben isoliert. Davon stammten jeweils 17 aus Spenderherzen und 19 aus insuffizienten explantierten Herzen. In der folgenden Tabelle sind die Spenderherzen K1 bis K17 als Kontrollgruppe und die Patientenherzen P1 bis P19 aufgeführt. Auch hier sind, soweit vorhanden, klinische Daten und Diagnosen ergänzt worden.

Bezeichnung	Diagnose	Geschl.	Alter	Blutdruck	NYHA	BMI in kg/m ²
K1	Spender	weiblich	63			21,6
K2	Spender	weiblich	25	100/70		22,0
K3	Spender	weiblich	52	120/80		21,0
K4	Spender	männlich	18			
K5	Spender	männlich	20			
K6	Spender	männlich	46	150/70		23,4
K7	Spender	männlich	61			
K8	Spender	männlich	55			22,0
K9	Spender	männlich	60			24,8
K10	Spender	männlich	58	120/60		25,9
K11	Spender	weiblich	53			
K12	Spender	weiblich	43	150/80		24,8
K13	Spender	männlich	63			24,9
K14	Spender	weiblich	57			
K15	Spender					
K16	Spender					
K17	Spender					
P1	DKMP	weiblich	58	115/71	III	21,8
P2	DKMP	männlich	51	130/70	III	20,4
P3	DKMP	männlich	49	140/80	IV	21,6
P4	DKMP	männlich	39	150/70	IV	21,8
P5	DKMP	männlich	57	120/60	III	22,0
P6	DKMP	männlich	49	100/70	IV	21,9
P7	DKMP	männlich	29	90/60	III	21,4
P8	DKMP	männlich	40	154/87	IV	22,4
P9	DKMP	männlich	46	90/60	III	28,4

P10	DKMP	männlich	55	110/70	III	29,3
P11	DKMP	männlich	54	110/60	III	29,1
P12	DKMP	männlich	47	140/110	III	30,5
P13	DKMP	männlich	38	115/70	III	31,0
P14	DKMP	männlich	49	130/70	III	31,3
P15	DKMP	männlich	51	110/77	III	28,7
P16	DKMP	männlich	42	120/75	III	32,4
P17	DKMP	männlich	60	130/80	III	29,0
P18	DKMP	männlich	52	150/95	III	26,5
P19	DKMP	männlich	43	90/60	III	28,1

Tabelle 10: Verwendete Proben im Western Blot. Spender: mittleres Alter 48,1 Jahre, Standardabw. 15,9 Jahre. 35% weiblich, 47% männlich, 17% unbekannt. Patienten: mittleres Alter 47,8 Jahre, Standardabw. 7,9 Jahre. 5% weiblich, 95% männlich.

2.2 Methoden

2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz auf Myokard Paraffinschnitten

Die Immunfluoreszenz ist eine lichtmikroskopische Technik zur Charakterisierung von zellulären Strukturen. Sie basiert auf der hohen Affinität zwischen Antikörpern und ihren Antigenen. Spezifische mono- oder polyklonale Antikörper, die aus zuvor immunisierten Tieren gewonnen wurden, detektieren dabei ihr Antigen in oder auf Zellen, Gewebeschnitten etc. Diese Primärantikörper tragen selbst antigene Determinanten, gegen die sich der Fluoreszenzmarker-gekoppelte Zweitantikörper richtet. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können die Fluoreszenzmarker Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Indocarbocyanin (Cy3) sichtbar gemacht werden.

Kofärbungen können mit Primärantikörpern aus verschiedenen Spezies und Sekundärantikörpern mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern durchgeführt werden.

Die Formalin-fixierten Myokardproben werden in 5 µm dünne Schichten geschnitten, auf Objektträger gebracht und über Nacht bei 60°C getrocknet. Dann müssen die Schnitte 2 mal 5 Minuten in Roticlear oder Xylol entparaffinisiert werden. Die Äquilibration erfolgt durch eine absteigende Alkoholreihe, jeweils 10 Minuten in 100%, 96%, 80% und 70% Ethanol. Zum Schluss verbleiben die Schnitte 10 Minuten in Millipore H₂O.

Da durch die Fixierung Antigene maskiert werden und somit Bindungsstellen den Antikörpern unzugänglich sein können, werden die Schnitte 3 mal 5 Minuten in Citratpuffer bei 600 Watt in der Mikrowelle gekocht. Der Puffer wird dabei jedes Mal gewechselt und vorgekocht, damit die Temperatur gleichmäßig hoch bleibt. Nach der Antigendemaskierung verbleiben die Schnitte 20 Minuten im Puffer zum Abkühlen.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers möglichst zu verhindern, wird 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Rinderserum geblockt. Dazu werden 5% BSA in PBS-T gegeben.

Der Primärantikörper (bei Kofärbungen auch mehrere) wird 1:100 in PBS-T-BSA verdünnt auf den Gewebeschnitt gegeben. Er wird 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper werden 3 mal 10 Minuten in PBS-T abgewaschen.

Danach wird wieder 60 Minuten geblockt (siehe erstes Blocking).

Die folgenden Schritte sollen möglichst in Dunkelheit durchgeführt werden, da Fluoreszenzmarker lichtempfindlich sind:

Der Sekundärantikörper (bei Kofärbungen auch mehrere) wird ebenfalls 1:100 in PBS-T-BSA verdünnt und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper werden 3 mal 10 Minuten in PBS-T abgewaschen.

Da humanes Myokard eine Eigenfluoreszenz besitzt, die evtl. spezifische schwache Signale überstrahlt, wird eine Sudan-Schwarz-Färbung angeschlossen. Dazu wird 0,5%iges Sudan-Schwarz in 70% Ethanol gelöst und der Schnitt 30 Minuten gefärbt. Abschließend werden die Präparate 10 Minuten in PBS-T gewaschen und mit Fluoreszenzmedium eingedeckt. Das Deckglas wird mit Nagellack an den Rändern versiegelt und die Präparate bei -20°C gelagert. So bleibt das Fluoreszenzsignal über mehrere Wochen stabil.

Zum Ausschluss von unspezifischen Antikörperbindungen wurden hier zu jeder Färbung Kontrollen durchgeführt. Dabei wurde zur Kontrolle der Autofluoreszenz jede untersuchte Probe ohne Zugabe von Primär- und Sekundärantikörper allen Färbeschritten unterzogen. Des Weiteren wurde jede Probe einer Negativkontrolle unterzogen, wobei der Primärantikörper weggelassen, und somit die Spezifität des Sekundärantikörpers festgestellt wurde.

Bei allen für die Kofärbungen verwendeten Sekundärantikörpern wurden Kreuzreaktionen mit anderen Primärantikörpern durch Kreuzproben ausgeschlossen.

2.2.1.1 DAPI-Färbung

Zum Anfärben von Zellkernen kann eine DAPI- Färbung nach dem Sekundärantikörper zwischen den Wasch-Schritten durchgeführt werden. DAPI wird 1:20000 verdünnt und eine Minute auf das Präparat gegeben. Dann wird das Waschen mit PBS-T wie beschrieben fortgesetzt.

2.2.1.2 Bildanalyse und Auswertung

Verschiedene Vergrößerungen der gefärbten Myokardschnitte wurden digital fotografiert mit Hilfe des Mac Programms Open Lab. Die größte gewählte Vergrößerung war dabei 630-fach. Für die Auswertung der Kofärbungen wurden die Bildebenen am Computer übereinander gelegt. Die Bilder wurden von zwei Personen unabhängig und verblindet beurteilt und die Stärke der Expression beider Rezeptoren auf einer ordinalen Skala in Kategorien von (-) = keine Expression, (+) = schwache Expression, (++) = mittlere Expression bis (+++) = starke Expression eingeordnet. Die Werte wurden mittels Q-Q-Diagramm auf Normalverteilung hin untersucht. Die Auftrittshäufigkeiten jeder Kategorie

wurden dann mittels Chi-Quadrat-Test mit Hilfe des SPSS-Programms auf Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hin untersucht.

2.2.2 Proteinextraktion aus Myokardgewebe

Die gefrorenen Myokardproben werden auf Trockeneis zerkleinert und von sichtbarem Bindegewebe befreit. Dabei ist darauf zu achten, dass die Proben niemals auftauen. Ungefähr 60 mg schwere Stücke werden in bereitgestellte Röhrchen überführt.

Nun werden die Füllgewichte der Röhrchen bestimmt (*Myokardgewicht = Füllgewicht - Leergewicht*) und alle Proben bis zur Homogenisation in Stickstoff gelagert. Die Probe wird nach dem Wiegen auf Eis umgelagert. Nach leichtem Antauen beginnt die Homogenisation.

Homogenisiert wird mechanisch im „Fast Prep“-Gerät. Der Proteinextraktionspuffer sowie Keramikkugeln, die das Gewebe zermahlen, werden zu der Probe in das Gefäß gegeben. Die Einstellung des Geräts erfolgt auf Stufe vier, dann wird 20 Sekunden homogenisiert und der Vorgang evtl. wiederholt.

Nach der Homogenisation lässt man die Proben 20 Minuten auf Eis lysieren, danach werden sie 10 Minuten zentrifugiert bei 4°C mit 14.000 rpm. Die Proben werden dann vorsichtig aus der Zentrifuge genommen, eine evtl. bestehende Fettschicht abgenommen und der wässrige Überstand in ein neues Behältnis überführt. Das extrahierte Protein kann aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert werden.

2.2.3 Proteinextraktion aus Zellen

Zuerst werden die subkonfluenten Zellen in ihren Kulturschalen mit PBS gewaschen. Nach dem Abgießen und Zugabe von 1ml PBS pro Schale werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers im PBS gesammelt und das Lysat in ein Röhrchen überführt. Es folgt eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200 rpm. Der Überstand wird abgegossen und zum Homogenisieren des verbliebenen Pellets Protein-Extraktions-Puffer hinzugegeben. Durch Zugabe des Puffers und kurzes mischen wird das Zellpellet gelöst. Dann lässt man die Probe 20 Minuten eisgekühlt lysieren. Die lysierten Proben werden wieder kurz gemischt und bei 14.000 rpm und 4°C zehn Minuten lang zentrifugiert. Die Proben werden vorsichtig aus der Zentrifuge genommen, eine evtl. bestehende Fettschicht abgenommen und der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die gewonnenen Proteine können ebenfalls bei -80°C gelagert werden.

2.2.4 Proteinmessung

Die Bestimmung des Proteingehaltes der gewonnenen Proteinlösung erfolgt auf einer ELISA-Platte mit Flachboden im Lesegerät. Mit einer Albuminstandardlösung wird eine Konzentrationsreihe pipettiert und diese der Tabelle entsprechend im Doppelansatz auf die ELISA-Platte aufgetragen. Als Proteinstandard dient bovines Serumalbumin. Die Proteinproben werden in verschiedenen Verdünnungen ebenfalls aufgetragen. Die Tabelle zeigt beispielhaft eine Proteinbestimmung von drei verschiedenen Proben.

	1	2	3	4	5	6
A	Blank (H ₂ O)	Blank (H ₂ O)	Probe 1 (1:10) 2 µl	Probe 1 (1:10) 2 µl	Probe 3 (1:10) 2 µl	Probe 3 (1:10) 2 µl
B	Alb.-St. 100 µg/ml	Alb.-St. 100 µg/ml	Probe 1 (1:10) 5 µl	Probe 1 (1:10) 5 µl	Probe 3 (1:10) 5 µl	Probe 3 (1:10) 5 µl
C	Alb.-St. 200 µg/ml	Alb.-St. 200 µg/ml	Probe 1 2 µl	Probe 1 2 µl	Probe 3 2 µl	Probe 3 2 µl
D	Alb.-St. 300 µg/ml	Alb.-St. 300 µg/ml	Probe 1 5 µl	Probe 1 5 µl	Probe 3 5 µl	Probe 3 5 µl
E	Alb.-St. 400 µg/ml	Alb.-St. 400 µg/ml	Probe 2 (1:10) 2 µl	Probe 2 (1:10) 2 µl		
F	Alb.-St. 500 µg/ml	Alb.-St. 500 µg/ml	Probe 2 (1:10) 5 µl	Probe 2 (1:10) 5 µl		
G	Alb.-St. 1000 µg/ml	Alb.-St. 1000 µg/ml	Probe 2 2 µl	Probe 2 2 µl		
H	Alb. St. 2000 µg/ml	Alb. St. 2000 µg/ml	Probe 2 5 µ	Probe 2 5 µ		

Tabelle 11: Beispiel für Belegung der ELISA-Platte

Jede Probe wird mit H₂O auf ein Volumen von 20µl aufgefüllt. Dann werden pro „Well“ 300 µl „protein assay reagent“ ergänzt, welches eine Farbreaktion mit den Proteinen verursacht. Der Lysispuffer wird als Negativkontrolle wie eine normale Probe behandelt und auf derselben Platte gemessen. Danach wird die Platte zugedeckt und 30 Minuten bei 37°C im Hybridisierungsofen gelagert. Nach Eintritt der Farbreaktion erfolgt die Proteinmessung im Lesegerät. Die Absorption dieses Farbkomplexes wird bei 550 nm photometrisch gemessen. Der Proteingehalt der zu bestimmenden Probe ergibt sich aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichgeraden. Die Werte werden als µg/ml ausgegeben. Daher müssen die Messwerte der Originallösungen mit ihren entsprechenden Verdünnungsfaktoren multipliziert werden. Bei der Auswertung der ermittelten Werte muss nun die Extinktion des Lysispuffers berücksichtigt werden, um die tatsächliche Proteinkonzentration zu ermitteln.

2.2.5 Western Blot

Im Western Blot werden Proteine zunächst nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt, dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert („Blotting“) und schließlich durch Reaktion mit einem spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. So können auch geringe Proteinmengen in einem Proteingemisch nachgewiesen werden. Das Prinzip der Antikörperhybridisierung basiert auf den antigenen Eigenschaften des Proteins, gegen das sich der Antikörper richtet. Es können zu jedem Protein verschiedene Antikörper existieren, die sich gegen unterschiedliche Aminosäuren-Sequenzen des Proteins richten. Der Zweitantikörper ist Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt und erzeugt bei Umsetzung mit einem Reagenz eine Chemolumineszenz, welche einen aufgelegten Röntgenfilm belichtet.

2.2.5.1 Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dafür wird zwischen zwei Glasplatten ein Polyacrylamidgel gegossen, dessen Zusammensetzung danach variiert, in welcher Größenordnung sich das gesuchte Protein befindet. Das Gel setzt sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen. Für ein großes Gel (22cm mal 20cm, BioRAD) oder 2 Minigele (10cm mal 10cm, BioRAD) benötigt man die in Tabelle 12 aufgeführten Chemikalien.

	Trenngel (10%) für 10 ml	Sammelgel (5%) für 5 ml
H ₂ O (Millipore)	4,0 ml	3,4 ml
30% Acrylamidmix	3,3 ml	0,83 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	2,5 ml	-
1.0M Tris (pH 6.8)	-	0,63 ml
10% SDS	0,1 ml	0,05 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,004 ml	0,005 ml
Pyronin Y (Farbstoff)		0,005 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung Polyacrylamidgel

Zuerst wird das noch flüssige Trenngel zwischen zwei Glasscheiben gegossen. Dann wird es mit H₂O bedeckt. Nach ungefähr 45 Minuten ist es auspolymerisiert. Das Wasser wird abgegossen und zusätzlich mit Filterpapier abgesaugt. Dann wird das Sammelgel aufgegossen und sofort ein Kamm hineingesteckt. So entstehen Taschen für die

Proteine. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert ist, kann das Gel benutzt oder bei 4°C maximal einen Tag gelagert werden.

2.2.5.2 Auftragen der Proteine

Falls unterschiedliche Mengen an Proteinen eingesetzt werden, werden diese mit Millipore-H₂O auf gleiche Volumina verdünnt. Den Proben wird ein reduzierender Gelladepuffer im Verhältnis 4:1 zugesetzt und das Gemisch fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben werden nach dem Abkühlen in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die eingesetzten Proteinmengen betragen 12µg pro Spur für große Gele. Eine Bahn jedes Polyacrylamidgels wird mit 5µl Marker zur Bestimmung der Proteingewichte beladen. Die darauf folgende Elektrophorese im Elektrophoresepuffer zur Proteinauftrennung erfolgt für große Gele 3 Stunden und für kleine eine Stunde bei konstanter Spannung von 100 V, einer Stromstärke von 350-400 mA und einer Leistung von 400W bei 4°C.

Nach der Elektrophorese wird das Gel 10 Minuten in frischem Transferpuffer gewaschen. Die Nitrozellulosemembran wird gleichzeitig kurz in Millipore H₂O gewaschen und die letzten 10 Minuten vor dem Blotten in Transferpuffer äquilibriert.

Für die Proteinmessung der verwendeten 36 humanen Myokardproben wurden jeweils 4 große Gele aus demselben 12%igen Polyacrylamidansatz gegossen. Von den jeweils 24 Taschen wurde eine für den „proteinladder“, 5 für die Eichgerade und die verbleibenden 18 Taschen für 9 Proben im Doppelansatz verwendet, so dass insgesamt alle 36 Proben parallel laufen konnten. Auf jedes Gel wurden sowohl Patienten- als auch Kontrollproben aufgetragen, um einen systematischen Fehler auszuschließen.

2.2.5.3 Blotting

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Transfer erfolgt im „Tank-Blot“-Verfahren als luftblasenfreies Gel-Membran-Blot-„Sandwich“ unter der Verwendung von Transferpuffer. Kleine Gele werden bei 4°C ,100 V und 350 mA für 2 Stunden geblottet. Große Gele werden unter denselben Bedingungen für 3 Stunden geblottet, hier werden aufgrund eines veränderten Widerstandes nur 40 V erreicht.

2.2.5.4 „Coomassie Blue“-Färbung

Nach dem Blotten kann man das Gel verwerfen oder eine Coomassie-Färbung anschließen. Mit ihr können evtl. noch im Gel verbliebene Proteine unspezifisch angefärbt und somit der vollständige Proteintransfer überprüft werden. Die Coomassie-Färbung erfolgt mit „Coomassie Brilliant Blue 250“ für 90 Minuten, die anschließende Entfärbung über Nacht mit Coomassie-Entfärbemittel, jeweils auf dem Schüttler bei Raumtemperatur.

2.2.5.5 Färbung der Nitrozellulosemembran

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen, kann die Nitrozellulosemembran nach Beendigung des Western Blots mit „Ponceau-Rot“-Lösung gefärbt werden. Dazu wird die Membran 1 Minute in „Ponceau-Rot“ geschüttelt und anschließend zweimal in Wasser gewaschen. Anschließend wird sie auf Filterpapier getrocknet und bis zur Antikörperhybridisierung bei 4°C gelagert. Auch nach dem Strippen einer Membran kann diese erneut mit „Ponceau-Rot“ gefärbt werden.

2.2.5.6 Antikörper-Hybridisierung

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu minimieren, wird die Nitrozellulosemembran in 0,5% TBS-T-BSA für eine Stunde unter sanftem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Membran 1 mal 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Verdünnungen und Blocking-Konzentration siehe Tabelle 13) erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dann wird die Membran wieder 1 mal 15 und 2 mal 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Der Spezies-spezifische Sekundärantikörper (siehe Tabelle 13) wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Membran wie beschrieben gewaschen.

Zur Detektion des Immunkomplexes aus Primär- und Sekundärantikörper wird nach den Waschschritten ein „Detection Reagent“ dazugegeben. Durch die katalytische Umsetzung der an den Sekundärantikörper gebundenen Peroxidase wird eine Chemolumineszenz erzeugt. Die Membran wird nach dem Abtropfen und Verpacken in Folie in der Dunkelkammer zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gelegt. Der Film wird je nach Stärke des erwarteten Signals 15 Sekunden bis zu 10 Minuten belichtet. In dieser Arbeit wurde jedes Gel nach der Hybridisierung mit LPA₁-Antikörper gestrippt und erneut mit einem GAPDH-Antikörper gefärbt. Die GAPDH ist ein nicht-reguliertes Protein, welches Aufschluss über die real eingesetzten Proteinmengen geben und die Proteinmessungen unter den Patienten vergleichbar machen soll.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Primärantikörper optimiert, wovon einer gegen den N- und einer gegen den C-Terminus des LPA₁-Rezeptors gerichtet war.

	Anti LPA ₁ c-terminal	Anti LPA ₁ n-terminal	Anti GAPDH auf gestripter Membran
Blocking	0,5% BSA in TBS-T	0,5% BSA in TBS-T	5% Quickblocker in TBS-T
1. Antikörper	1:1000 in 0,25% Blocking	1:1000 in 0,25% Blocking	1:50000 in TBS-T
2. Antikörper	1: 40000 Donkey Anti-Rabbit in 0,25% Blocking	1: 40000 Donkey Anti-Rabbit in 0,25% Blocking	1:50000 Donkey Anti-Mouse in Blocking
Detection Reagent	ECL Plus 5 Minuten	ECL Plus 5 Minuten	ECL 3 Minuten
Belichtungsdauer	5 Minuten	2 Minuten	15 Sekunden

Tabelle 13: Antikörper-Verdünnungen für den Einsatz auf Nitrozellulosemembranen

2.2.5.7 “Stripping“-Protokoll

Zur erneuten Antikörper-Hybridisierung der Nitrozellulosemembran kann diese mit Hilfe eines „Stripping“-Puffers von bereits gebundenen Antikörpern gereinigt, und somit wiederholt nutzbar gemacht werden.

Die Reinigung der Membran erfolgt für 30 Minuten bei 50°C unter leichtem Schütteln im Ofen. Darauf folgten drei Waschschrte von je 10 Minuten in TBS-T-Puffer. Zur Kontrolle der Unversehrtheit der Proteine werden sie erneut mit „Ponceau-Rot“ angefärbt.

2.2.5.8 Quantitative Auswertung

Die Quantifizierung der Western Blot-Banden erfolgte nach dem Einscannen der Röntgenfilme mit Hilfe eines Auswertungsprogramms. Dabei wurde die Punktdichte der Banden ermittelt. Für jedes Gel konnten so eine Regressionsgerade aus der pipettierten Eichgeraden sowie die zugehörige Geradengleichung bestimmt werden. Mit dieser Gleichung konnten die gesuchten Proteinmengen für LPA₁ ermittelt werden. Die GAPDH-Färbung wurde ebenso ausgewertet. Dann wurde der Quotient aus LPA₁-Protein/GAPDH-Protein gebildet, wodurch mögliche Fehler durch verschiedene Konzentrationen der eingesetzten Proben ausgeglichen werden. Die Proben wurden auf vier Gele aufgetragen. Um diese vergleichbar zu machen wurde der Mittelwert der Kontrollen auf einem Gel jeweils gleich 100% gesetzt und die Quotienten aller Proben des

Gels auf diesen Wert bezogen. Da keine Normalverteilung vorlag, wurden die ermittelten Quotienten aus Kontroll- und Patientengruppe mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchung

Die 20 zur Verfügung stehenden Myokardproben wurden jeweils auf die Expression von LPA₁ und S1P₁ hin untersucht. Die Lokalisation der Rezeptoren innerhalb der vorkommenden Zellen und die Stärke der Expression wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert und die Patientenherzen mit den gesunden Herzen verglichen. Die folgenden Bilder zeigen eine repräsentative Auswahl der untersuchten Proben und wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, ausgewertet.

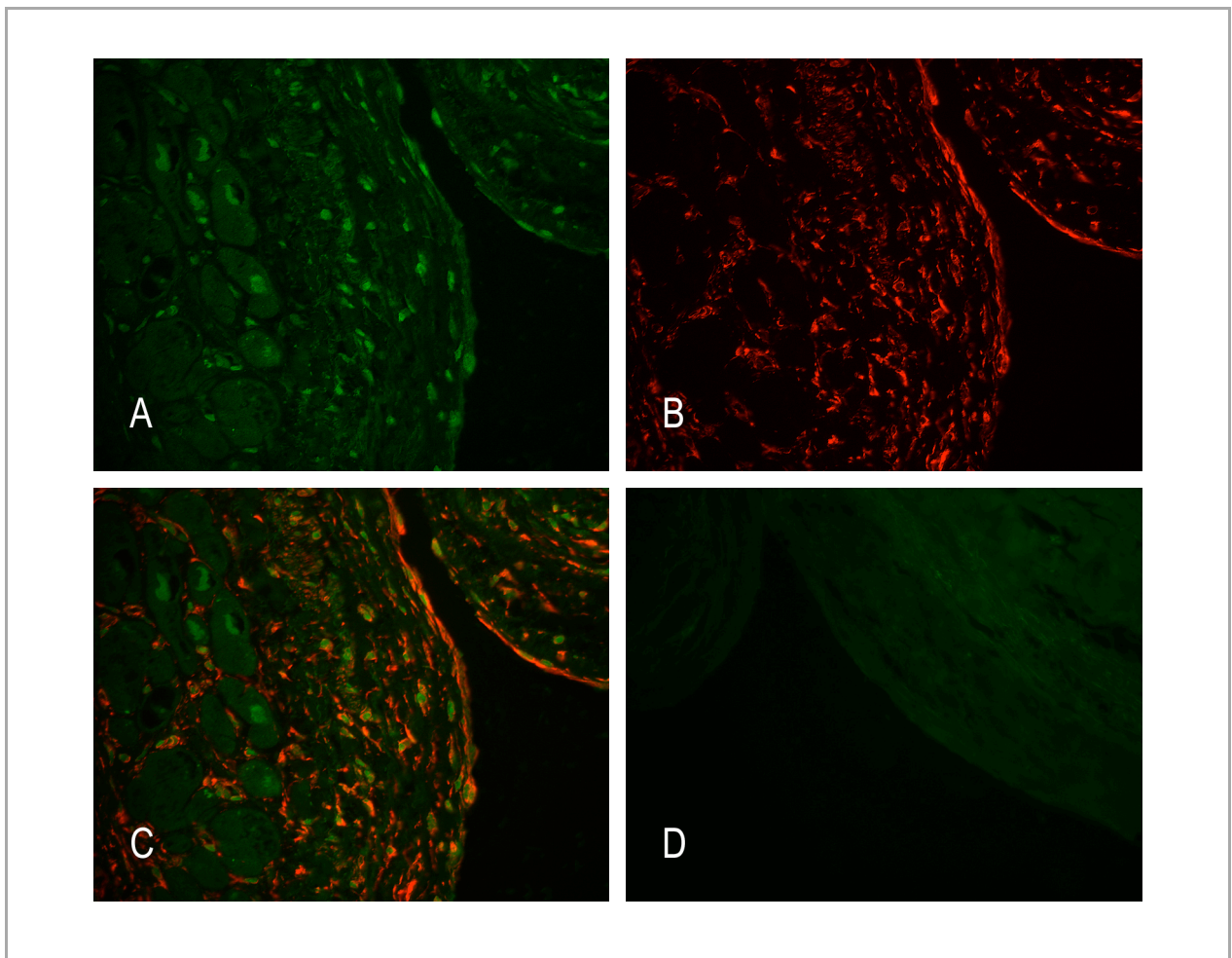


Abbildung 3: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von LPA₁ (grün) und Vimentin (rot)

Die Abbildungen 3A-D zeigen einen Schnitt durch das Myokard an der Innenseite des linken Ventrikels. Neben den Myozyten ist auch das Endokard angeschnitten. Dazwischen befindet sich eine Bindegewebsschicht aus Fibroblasten, die durch die Kofärbung gegen Vimentin sichtbar wird. Fibroblasten und Endothelzellen erscheinen hier rot.

Deutlich zu erkennen sind im FITC-Kanal die für LPA₁ stark positiven Zellkerne der Myozyten, Endothelzellen und Fibroblasten.

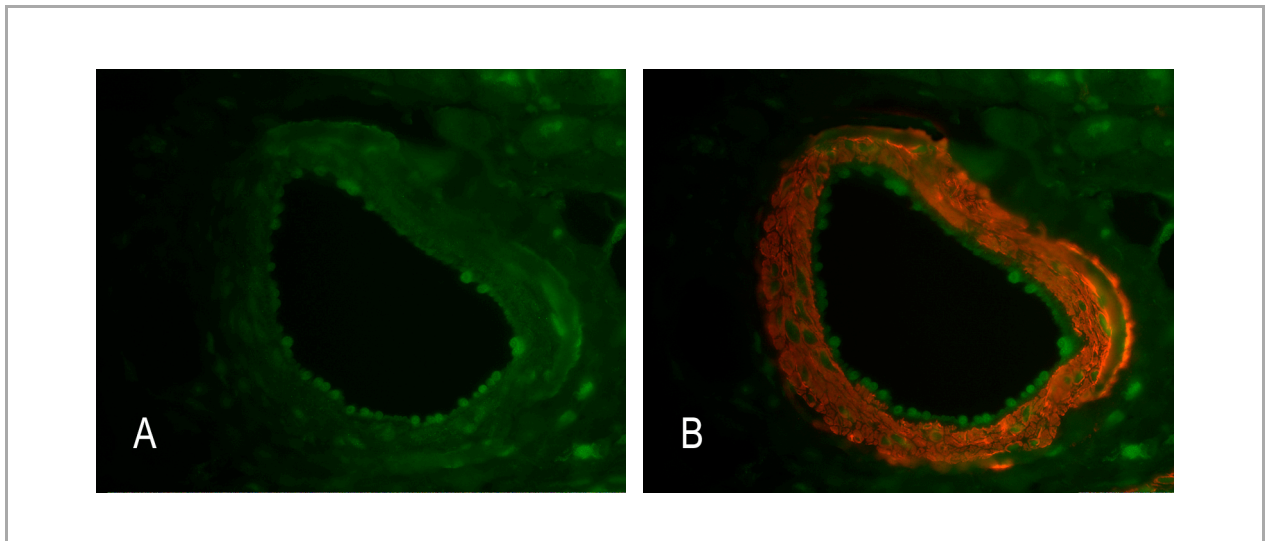


Abbildung 4: 630fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von LPA₁ (grün) und VSMC (rot)

Die Bilder 4A und B zeigen ein querschnittenes Blutgefäß im Myokard. Deutlich zu sehen sind die zum Lumen aufgereihten, stark LPA₁-positiven Endothelzellkerne sowie ebenfalls grün im rechten Teil des Bildes einige LPA₁-positive Myozytenkerne. Bild B zeigt überlagert eine VSMC-Färbung. Die VSMCs zeigen vereinzelt LPA₁ im Kern.

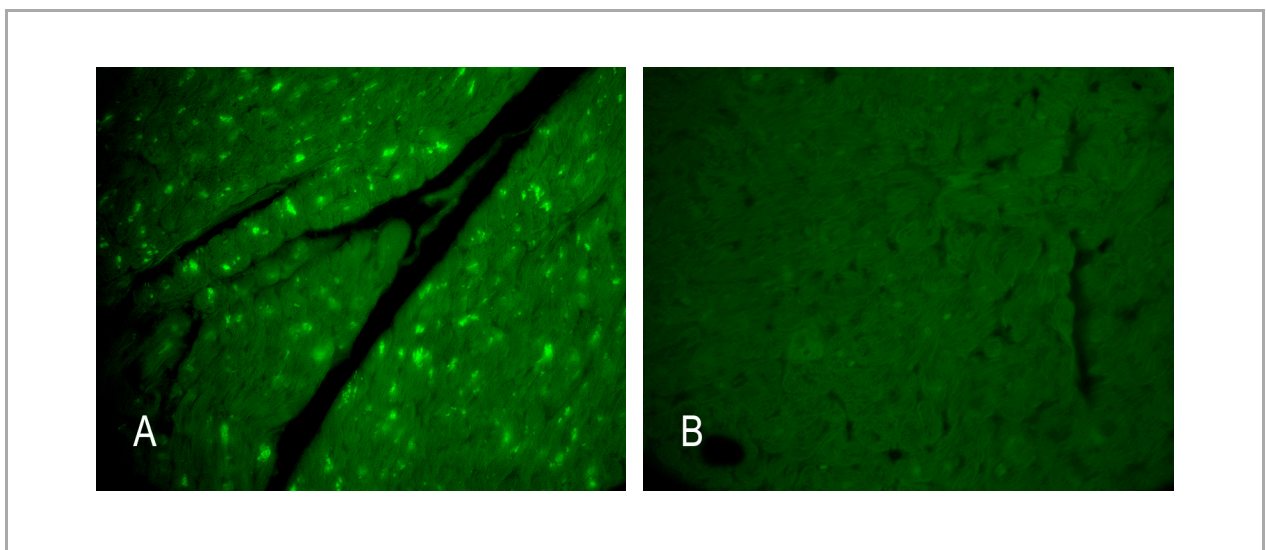


Abbildung 5: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von LPA₁ (grün)

Bild 5A zeigt ein Beispiel für starke LPA₁-Expression in Myozytenkernen, welche im FITC-Kanal leuchtend grün sichtbar werden. In B ist die entsprechende Negativkontrolle zu sehen.

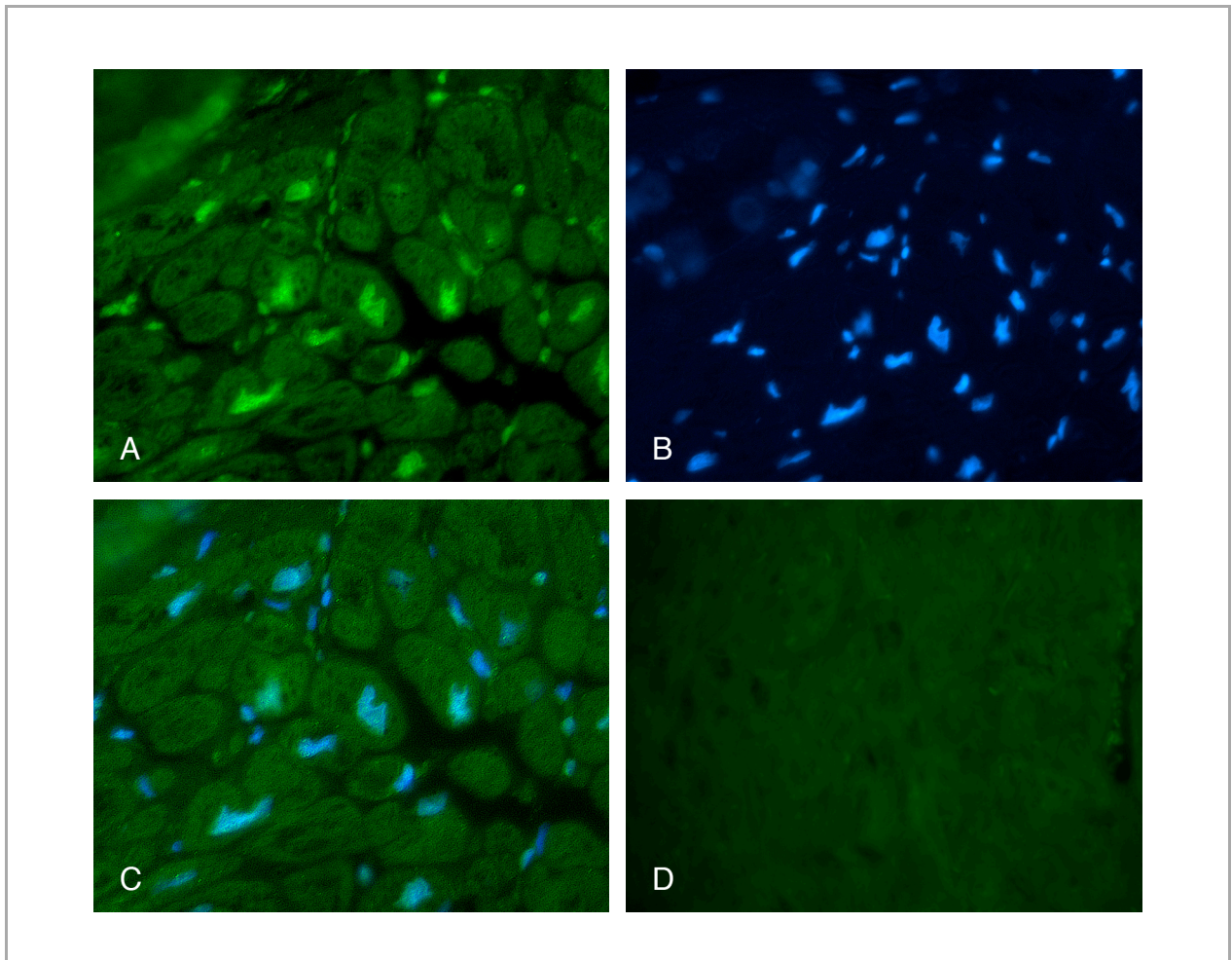


Abbildung 6: 630fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von LPA₁ (grün) und Zellkernen mit DAPI (blau)

Bild 6A zeigt querschnittene Myozyten einer DKMP-Probe, deren Kerne eine deutliche LPA₁-Expression aufweisen. Abb. B zeigt eine DAPI-Färbung desselben Schnittes. Die Zellkerne erscheinen hier blau. In Abb. C ist die Kolokalisation von LPA₁ und DAPI in den Zellkernen zu sehen. Die Überlagerung beider Signale erscheint hier in türkis. Das letzte Bild zeigt die Negativkontrolle.

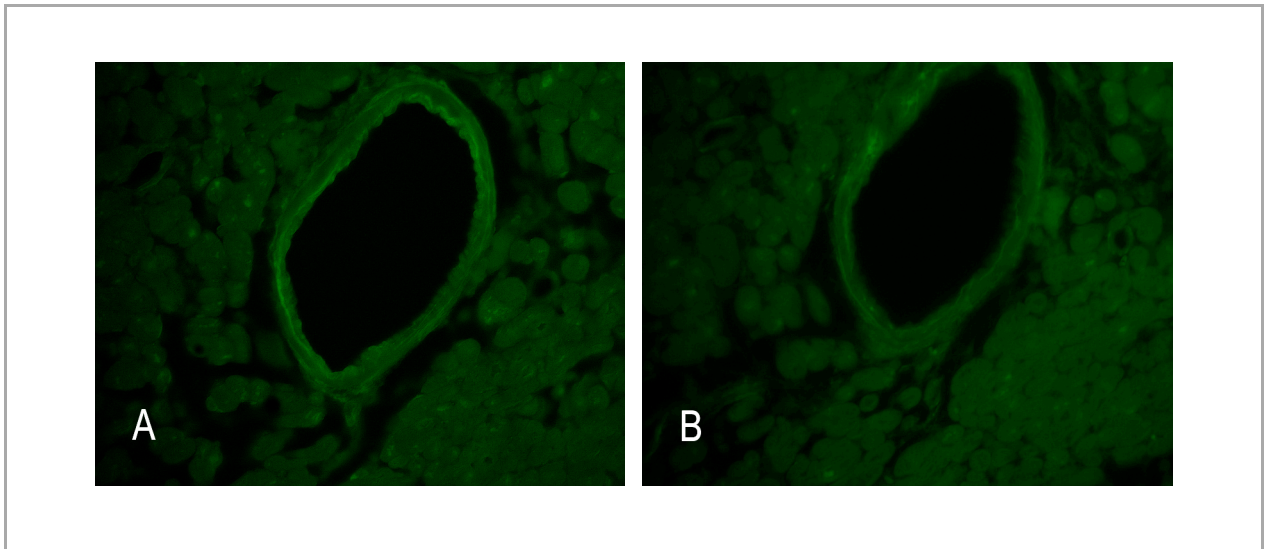


Abbildung 7: 400fache Vergrößerung einer Kontroll-Probe. Anfärbung von LPA₁ (grün)

Die Abbildung 7A zeigt ein LPA₁-negatives Präparat der gesunden Kontrollgruppe. Zu sehen ist ein Gefäßquerschnitt im Myokard. Das Endothel sowie die VSMCs zeigen kein positives Signal, und auch die umliegenden Myozyten erscheinen LPA₁-negativ. Es ist lediglich eine leichte Autofluoreszenz der Lamina elastica interna zu sehen. Abb. B zeigt die Kontrolle.

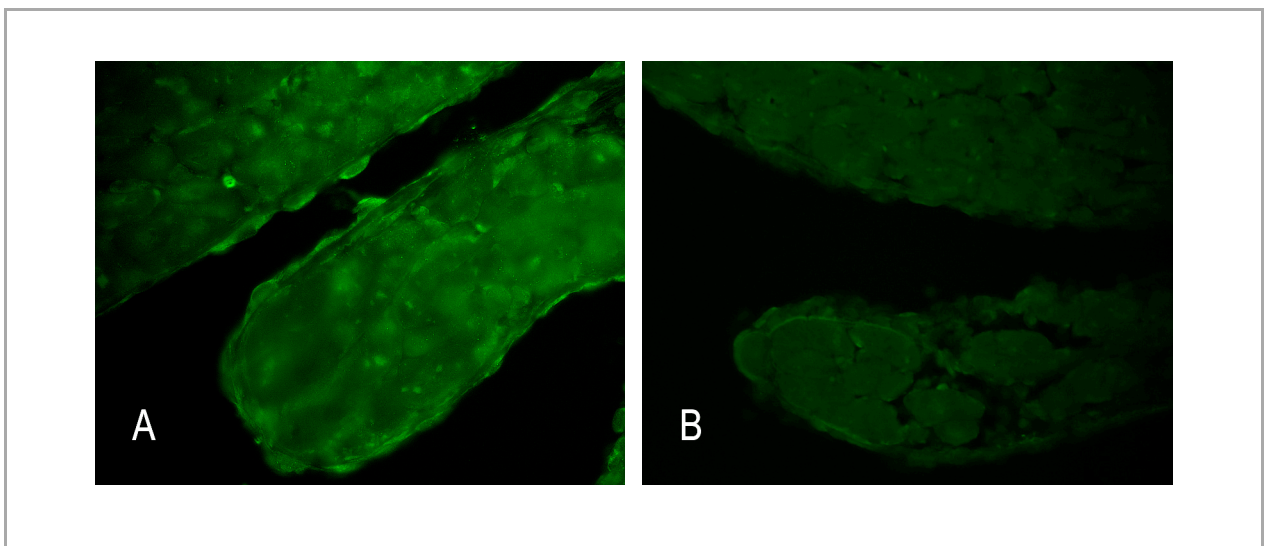


Abbildung 8: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von S1P₁ (grün)

Die Abbildungen 8A und B zeigen einen Schnitt durch das Myokard an der Innenseite des linken Ventrikels. Neben den Myozyten ist also auch das Endokard angeschnitten. Man erkennt die zytoplasmatische Lokalisation von S1P₁ in den Endothelzellen. Der Bereich des Zellkerns bleibt dabei ausgespart. Abb.B zeigt die Negativkontrolle.