

Abbildung 9: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von LPA₁ (grün) und VSMCs (rot)

Abb. 9A zeigt ein Blutgefäß mit Endothelzellen und einer breiten VSMC-Schicht. LPA₁ stellt sich in den Endothelzellen zytoplasmatisch und in den VSMCs kernlokalisiert dar. In der Kofärbung B ist zusätzlich die glatte Muskulatur der Gefäßwand mit „Anti-Alpha-Smooth-Muscle-Actin“ gefärbt, was den Aufbau der Gefäßwand gut erkennen lässt. Die Negativ-Kontrolle 9C zeigt kein Signal.

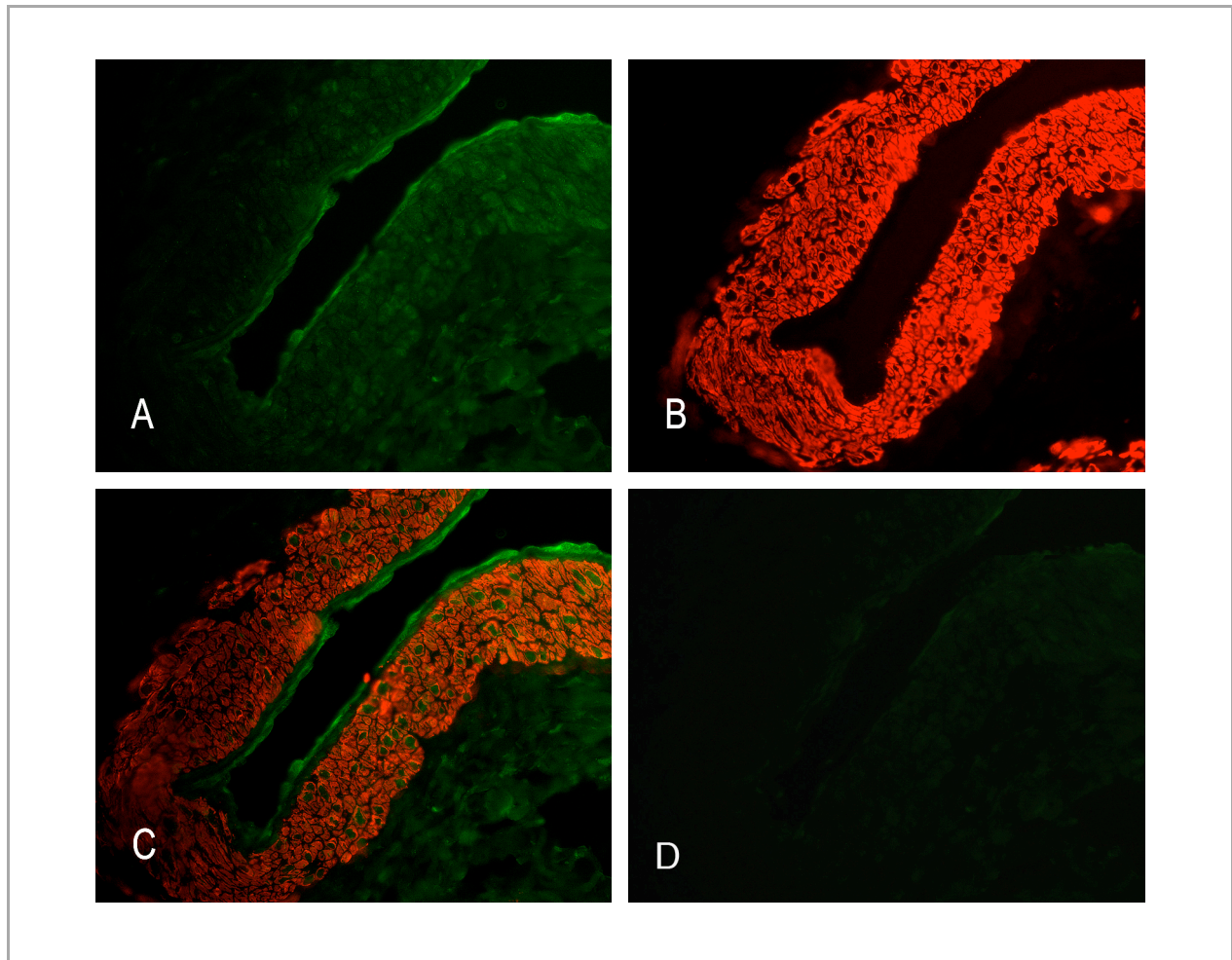


Abbildung 10: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von S1P₁ (grün) und VSMC (rot)

Die Bilder 10A-D zeigen ein Blutgefäß im Myokard. A zeigt eine Färbung mit Anti-S1P₁. Es liegt eine zytoplasmatische Lokalisation von S1P₁ in den Endothelzellen und schwächer auch in den VSMCs vor. Die VSMC-Schicht in der Gefäßwand ist in B durch Färbung gegen SMCA dargestellt. Bild D zeigt die Negativkontrolle.

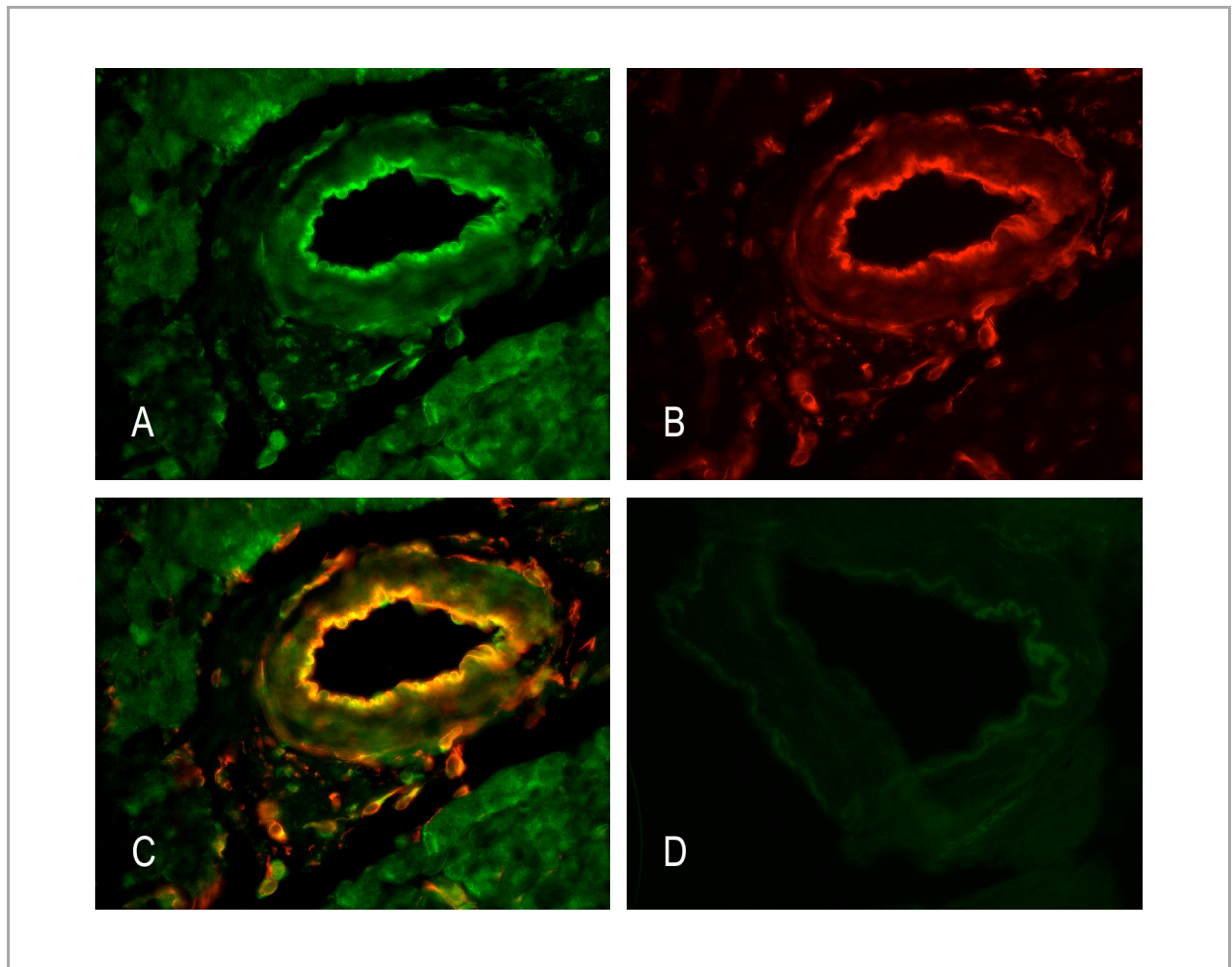


Abbildung 11: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfärbung von S1P₁ (grün) und Vimentin (rot)

Die Abbildungen 11A-D zeigen ein im Myokard gelegenes Gefäß in einer S1P₁- und Vimentin-Färbung. Die Fibroblasten unten im Bild sowie die Endothelzellen zeigen eine starke zytoplasmatische S1P₁-Expression. In Abb. C ist die Kolokalisation von Vimentin und S1P₁ zu sehen. Abb. D zeigt die Negativkontrolle.

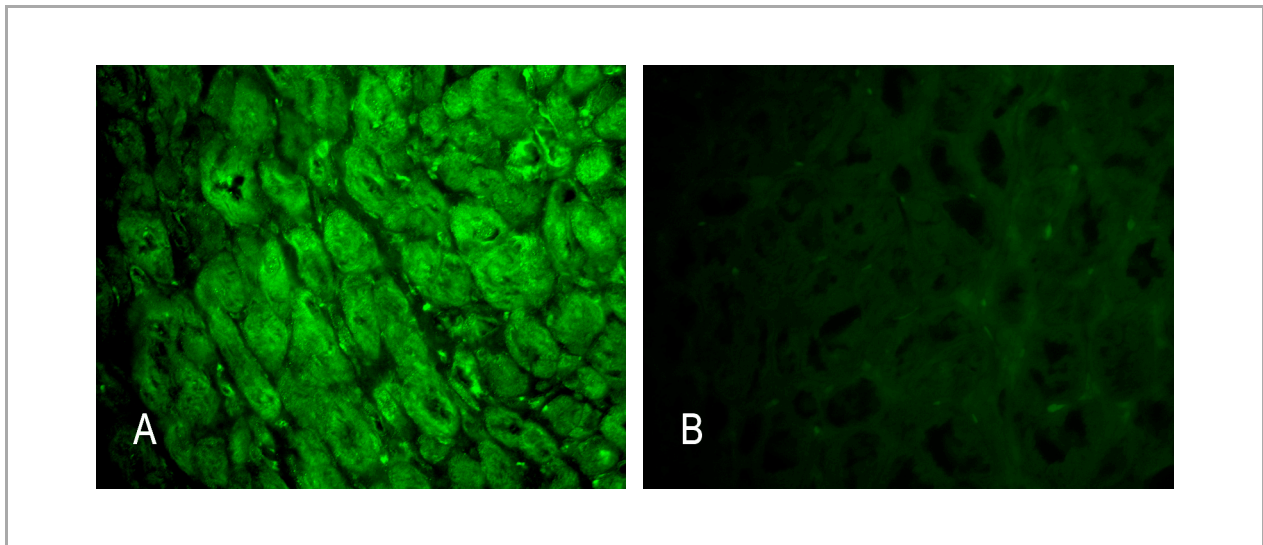


Abbildung 12: 400fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfarbung von S1P₁ (grün)

Bild 12A zeigt quer angeschnittene Myozyten, die eine intrazelluläre Lokalisation von S1P₁ aufweisen. B zeigt die zugehörige Negativkontrolle.

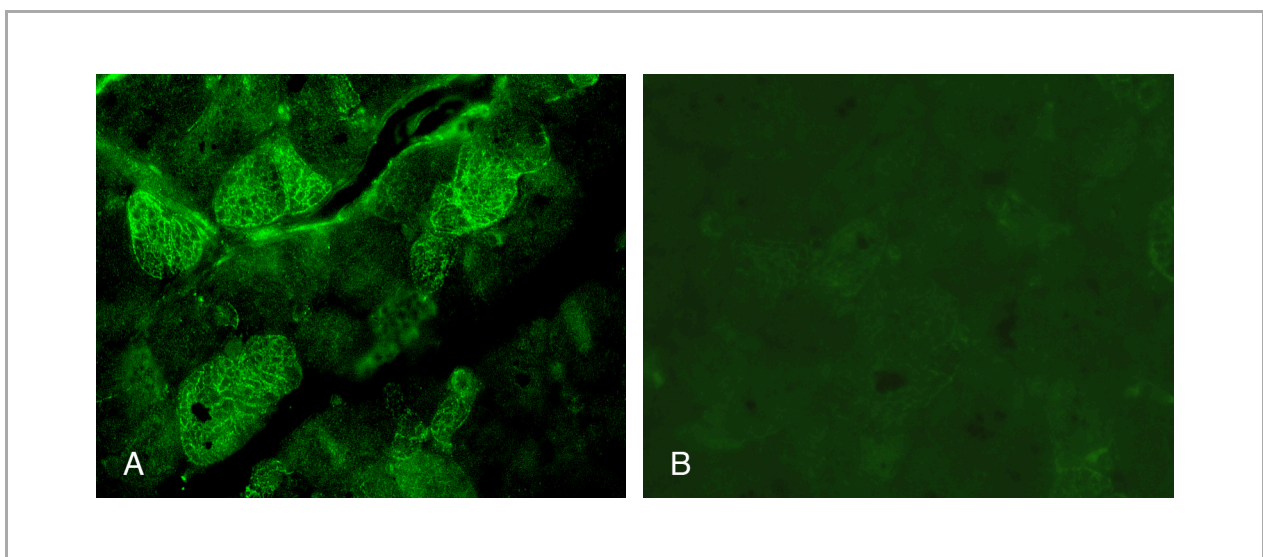


Abbildung 13: 630fache Vergrößerung einer DKMP-Probe. Anfarbung von S1P₁ (grün)

12A und B zeigen einen Querschnitt durch Myozyten, welche S1P₁ exprimieren. Das Muster entspricht dabei der typischen Cohnheimschen Felderung der Myozyten. Es handelt sich hierbei um kleine Zytoplasmastraßen, die die einzelnen Myofibrillen eines Myozyten voneinander trennen. Das S1P₁-Signal entspricht daher einer intrazellulären Expression des Rezeptors. In B ist die Negativkontrolle zu sehen.

3.1.1 Expressionsstärken von S1P₁ und LPA₁

In den Tabellen 14 und 15 wird die Stärke der Immunfluoreszenz-mikroskopisch ermittelten Expression von S1P₁ und LPA₁ in Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und VSMCs dargestellt. (-) steht dabei für „keine Expression“, (+) für „geringe Expression“, (++) für „mittlere Expression“ und (+++) für starke Expression. Bei den Endothelzellen, Fibroblasten und VSMCs handelt es sich jeweils nur um die im Myokard gelegenen Zellen. Die Proben k1-k10 bezeichnen dabei die Kontrollen, p1-p10 die Patienten

	S1P ₁ in Endothelzellen	S1P ₁ in Fibroblasten	S1P ₁ in VSMCs	S1P ₁ in Myozyten
k1	+	++	+	+
k2	++	++	-	-
k3	-	-	-	-
k4	+	+	-	+
k5	+	+++	++	+
k6	+	++	-	++
k7	++	+++	-	+
k8	+	++	+++	++
k9	+	++	-	+
k10	++	+++	+	++
p1	+++	+	+++	+
p2	++	+	-	+++
p3	+++	+++	-	++
p4	++	-	++	+++
p5	+	++	-	+++
p6	+	++	-	++
p7	+++	+	-	+++
p8	+++	+++	-	+
p9	+	++	-	++
p10	++	+	-	+++

Tabelle14: Expressionsstärke für S1P₁ in Endothelzellen, Fibroblasten, VSMCs und Myozyten. - = keine Expression, + = geringe Expression, ++ = mittlere Expression, +++ = starke Expression. k = Kontrolle, p = Patient.

	LPA ₁ in Endothelzellen	LPA ₁ in Fibroblasten	LPA ₁ in VSMCs	LPA ₁ in Myozyten
k1	-	-	-	+++
k2	+	-	-	-
k3	-	-	-	-
k4	-	-	-	++
k5	-	-	+	+
k6	-	-	-	-
k7	-	-	-	-
k8	-	-	-	-
k9	-	-	+	-
k10	+	+	+	-
p1	+++	-	+++	+
p2	+	-	-	++
p3	+	-	-	-
p4	++	-	+++	+++
p5	-	-	-	-
p6	++	-	-	++
p7	+++	+	+	+
p8	++	-	-	++
p9	++	-	++	+++
p10	++	+	-	++

Tabelle 15: Expressionsstärke für LPA₁ in Endothelzellen, Fibroblasten, VSMCs und Moyzyten. - = keine Expression, + = geringe Expression, ++ = mittlere Expression, +++ = starke Expression. k = Kontrolle, p = Patient.

Aus den Ergebnistabellen wurden für die Kombination jedes Zelltyps mit einem der beiden Rezeptoren die Anzahl von Patienten und Kontrollen mit einem der vier Ausprägungs-Merkmale ermittelt. So entstanden 8 Kreuztabellen. Für die graphische Darstellung wurde jedem Merkmal von „keine Expression“ bis „starke Expression“ ein verschiedener Farbton zugeordnet und die Anzahl von Individuen für jedes Merkmal als Balken in Y-Achsen-Richtung dargestellt. Die X-Achse wurde als Merkmal „krank“ oder „gesund“ definiert. Mittels des Chi-Quadrat-Tests wurde ermittelt, ob sich die Merkmalsausprägungen bei Patienten und Kontrollen signifikant unterscheiden. Die so ermittelten Balkendiagramme sowie die statistische Auswertung finden sich in den Kapiteln 3.1.2 bis 3.1.6.

3.1.2 Expression von S1P₁ und LPA₁ in Kardiomyozyten

Die im Präparatschnitt vorhandenen Myozyten wurden im Quer- und Längsschnitt betrachtet. Auf eine Kofärbung mit einem Myozytenmarker wurde aufgrund ihrer typischen Lage und morphologischen Charakteristika verzichtet. Die befundeten Myokardproben der DKMP-Patienten wiesen die typischen Kaliberunterschiede der Myozyten und teilweise kastenförmige Myozytenkerne auf.

In longitudinalen Anschnitten der Muskelzellen stellte sich S1P₁ in den Glanzstreifen und im quergestreiften Muster der Muskelzellen dar. In den Querschnitten zeigte sich eine zytoplasmatische und teilweise membranständige Expression.

LPA₁ zeigte sich in allen Schnittebenen im Bereich des Kerns und schwach im Zytoplasma lokalisiert.

Im Chi-Quadrat-Test konnte in den Patienten-Myozyten eine signifikant höhere Expression von S1P₁ gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, der p-Wert wurde mit 0,04 berechnet.

Für LPA₁ wurde mit einem p-Wert von 0,155 kein signifikanter Anstieg in Patienten-Myozyten gegenüber der Kontrollgruppe berechnet.

Auf den folgenden beiden Seiten werden die Daten für S1P₁ und LPA₁ in Myozyten als Kreuztabelle sowie graphisch dargestellt.

Expression		S1P ₁ -Expression in Myozyten				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	0	2	3	5	10
	gesund	2	5	3	0	10
Gesamt		2	7	6	5	20

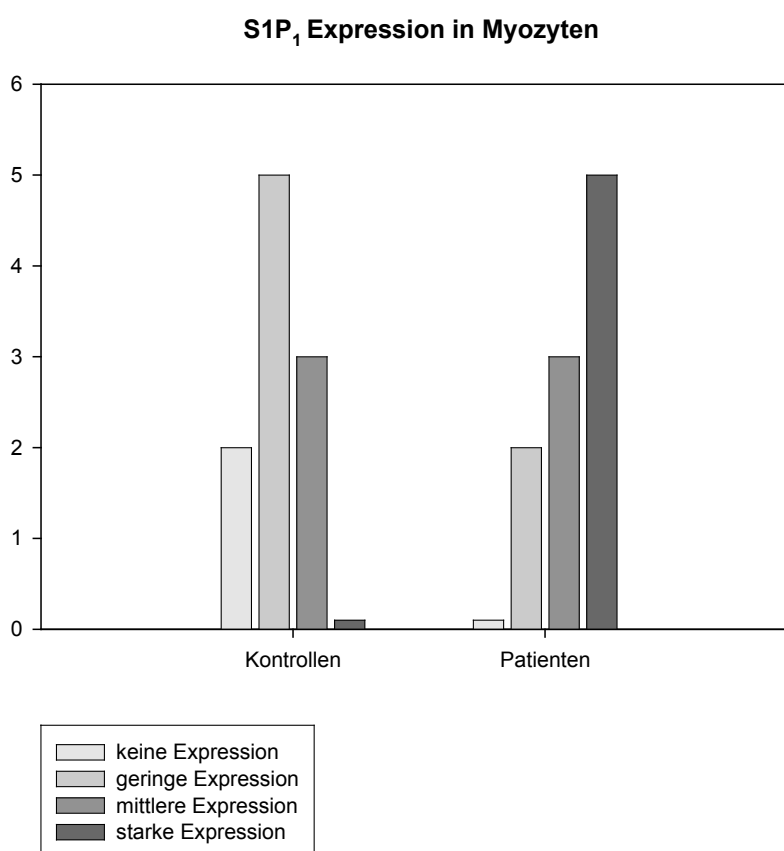
Tabelle 16: Diagnose * S1P₁ in Myozyten Kreuztabelle

Abbildung 14: S1P₁-Expression in Myozyten. Die Patientenherzen zeigen eine signifikant stärkere S1P₁-Expression in Myozyten als die Kontrollgruppe. $p = 0,04$

Expression		LPA ₁ -Expression in Myozyten				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	2	2	4	2	10
	gesund	7	1	1	1	10
Gesamt		9	3	5	3	20

Tabelle 17: Diagnose * LPA₁ in Myozyten Kreuztabelle

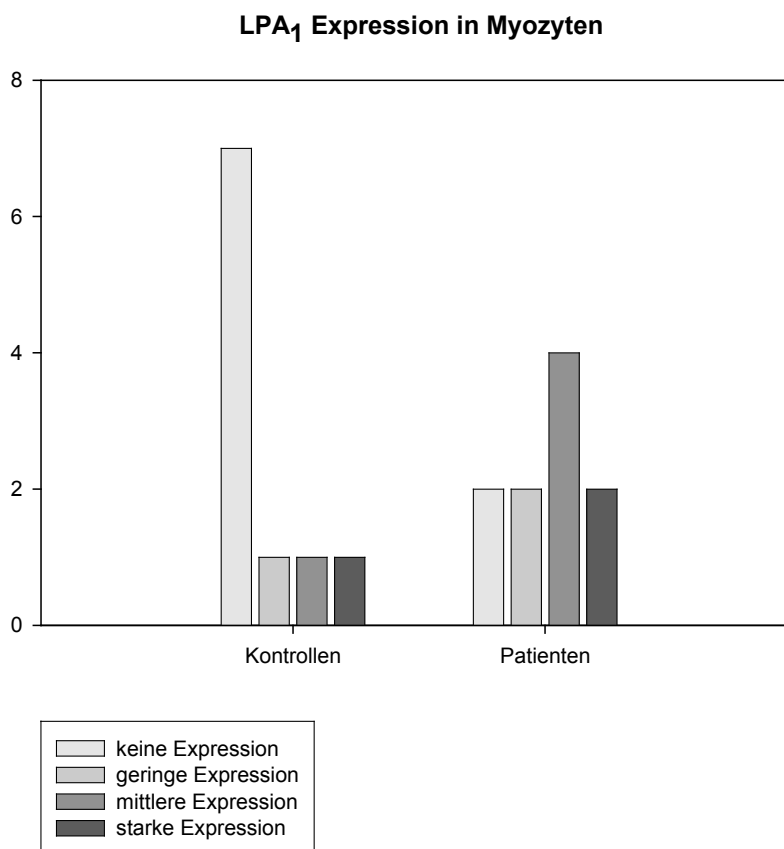


Abbildung 15: LPA₁-Expression in Myozyten. Die Myozyten der Patientenherzen zeigen keine stärkere Expression von LPA₁. $p = 0,155$

3.1.3 Expression von S1P₁ und LPA₁ in kardialen Endothelzellen

Es wurden die Endokard-Endothelzellen und Gefäß-Endothelzellen der im Herzen liegenden Blutgefäße beurteilt. Diese unterschieden sich innerhalb eines Präparats nicht erkennbar in Expression und Lokalisation der Rezeptoren, d.h. es wurde in der Auswertung nicht zwischen Endokard-Endothelzellen und denen in Blutgefäßen unterschieden. Die Zellen wurden durch ihre spezifische Lage sowie Kofärbung mit Vimentin-Ak und Faktor-VIII-Ak identifiziert.

S1P₁ zeigte teils eine zytoplasmatische, aber auch membranständige sowie perinukleäre Lokalisation. LPA₁ zeigt sich überwiegend im Kern und schwächer im Zytoplasma lokalisiert.

In Patientenherzen exprimierten Endothelzellen LPA_1 signifikant stärker als in den Kontrollherzen. Der p-Wert wurde hier mit 0,006 berechnet. Für $S1P_1$ konnte hier mit 0,112 kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Im Folgenden werden die Daten für $S1P_1$ und LPA_1 in Endothelzellen wiederum als Kreuztabelle und graphisch dargestellt.

Expression		S1P ₁ -Expression in Endothelzellen				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	0	3	3	4	10
	gesund	1	6	3	0	10
Gesamt		1	9	6	4	20

Tabelle 18: Diagnose * S1P₁ in Endothelzellen Kreuztabelle

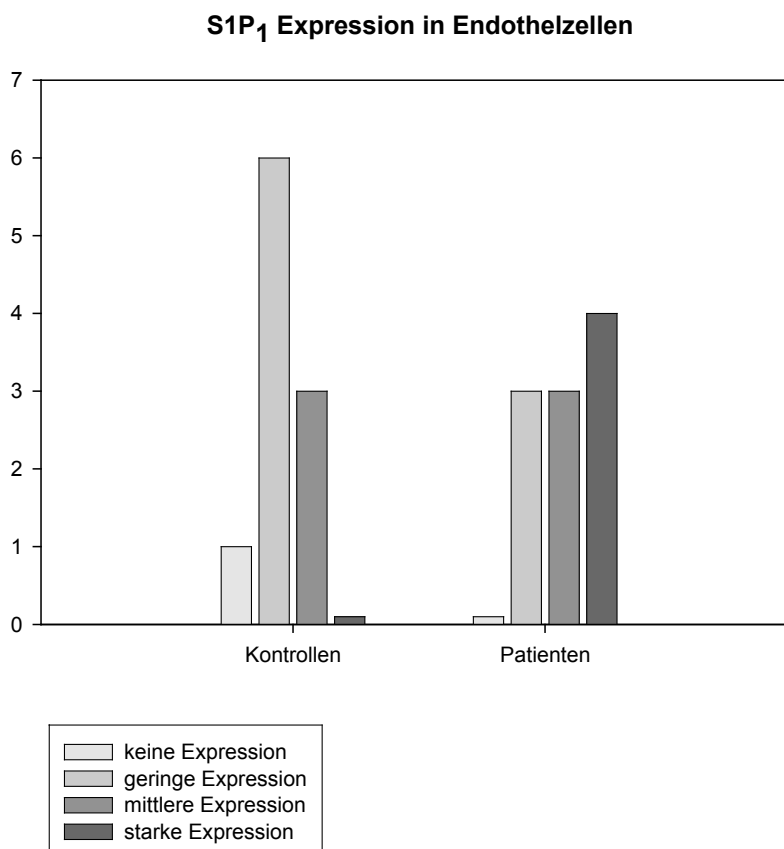


Abbildung 16: S1P₁-Expression in Endothelzellen. Es liegt kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen vor, der p-Wert liegt bei 0,112.

Expression		LPA ₁ -Expression in Endothelzellen				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	1	2	5	2	10
	gesund	8	2	0	0	10
Gesamt		9	4	5	2	20

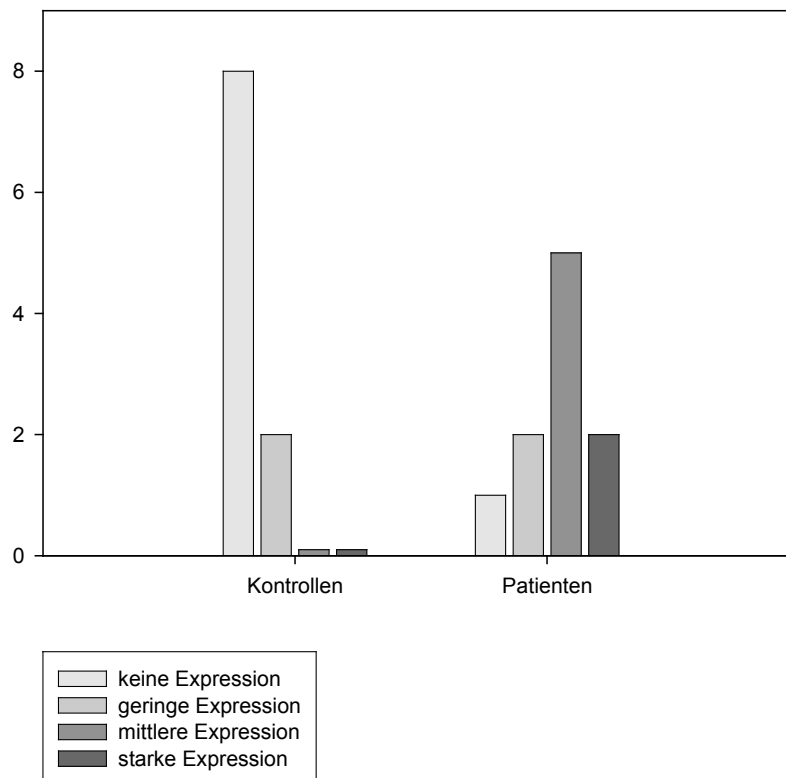
Tabelle 19: Diagnose * LPA₁ in Endothelzellen KreuztabelleLPA₁ Expression in Endothelzellen

Abbildung 17: LPA₁-Expression in Endothelzellen. Die Expression des Rezeptors in Endothelzellen der Patientengruppe ist signifikant höher als in der Kontrollgruppe. $p = 0,006$

3.1.4 Expression von S1P₁ und LPA₁ in „Vascular Smooth Muscle Cells“

Es wurde die glatte Gefäßmuskulatur der im Myokard liegenden Gefäße beurteilt. Die Zellen wurden durch Kofärbung mit „ α -Smooth-Muscle-Actin“ identifiziert.

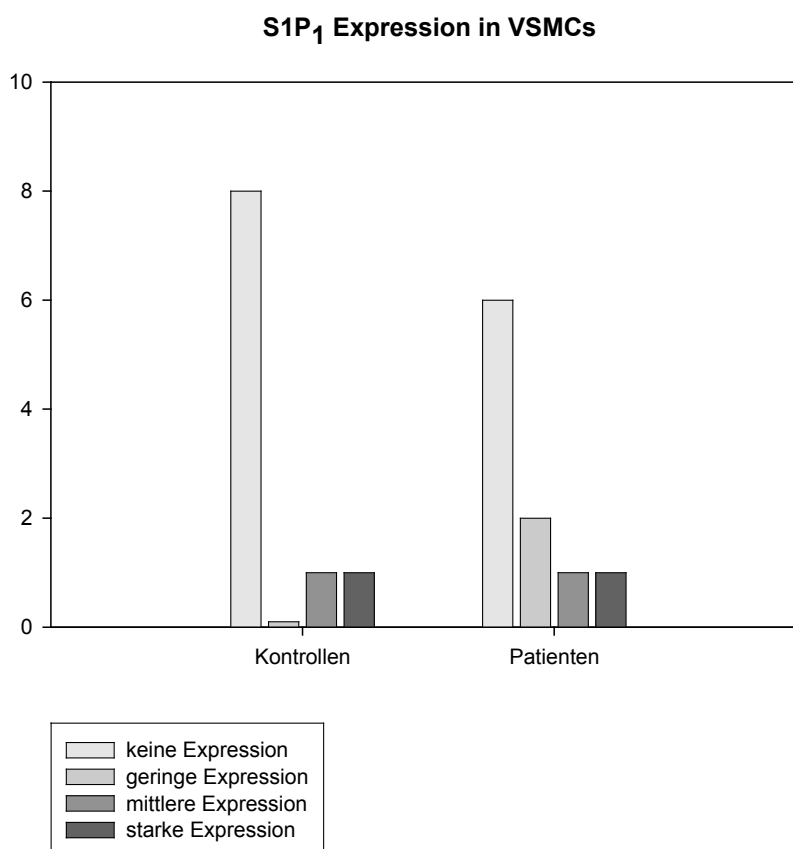
Insgesamt zeigten sich beide Rezeptoren seltener und schwächer exprimiert als in Myozyten und Endothelzellen. In der Expressionsstärke gab es große individuelle Unterschiede zwischen den Proben.

Das bereits beobachtete Lokisationsmuster trat auch hier wieder auf: S1P₁ war zytoplasmatisch und LPA₁ hauptsächlich im Kern lokalisiert.

Ein Unterschied hinsichtlich der Expressionsstärke von S1P₁ und LPA₁ zwischen DKMP- und Kontrollgruppe konnte mit einem $p=0,515$ für S1P₁ bzw. $p=0,253$ für LPA₁ nicht nachgewiesen werden.

Im Folgenden werden die Kreuztabellen und Balkendiagramme für S1P₁ und LPA₁ in den „Vascular Smooth Muscle Cells“ gezeigt.

Expression		S1P ₁ -Expression in VSMCs				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	8	0	1	1	10
	gesund	6	2	1	1	10
Gesamt		14	2	2	2	20

Tabelle 20: Diagnose * S1P₁ in VSMCs KreuztabelleAbbildung 18: S1P₁-Expression in VSMCs. Es ist keine Regulation der Patienten- gegenüber der Kontrollgruppe zu erkennen. Der p-Wert beträgt 0,515.

Expression		LPA ₁ -Expression in VSMCs				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	6	1	1	2	10
	gesund	7	3	0	0	10
Gesamt		13	4	1	2	20

Tabelle 21: Diagnose * LPA₁ in VSMCs Kreuztabelle

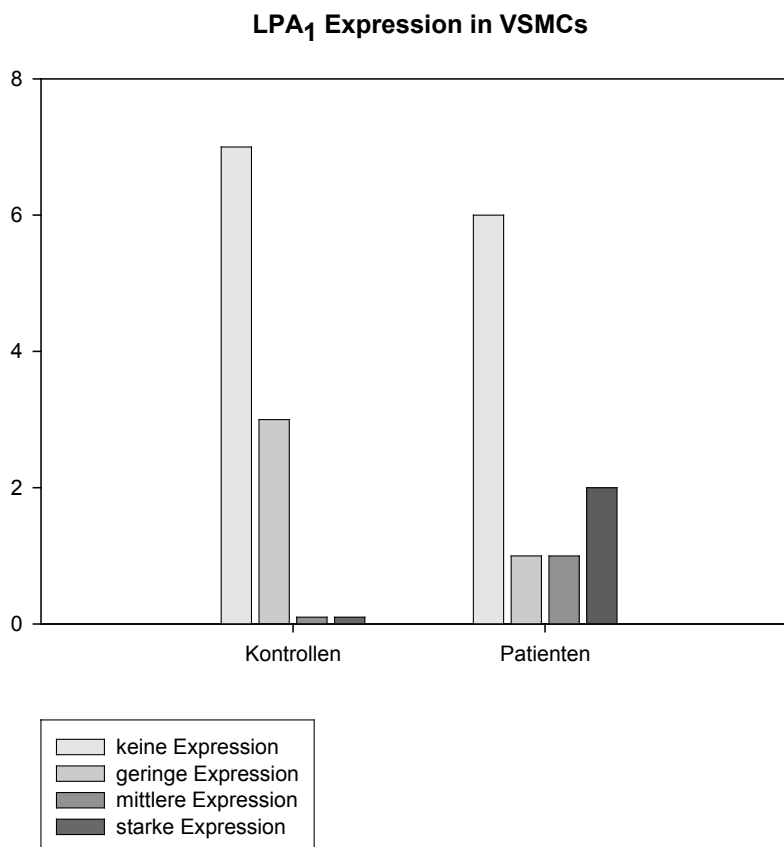


Abbildung 19: LPA₁-Expression in VSMCs. Es liegt kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke zwischen beiden Gruppen vor. Der p-Wert beträgt 0,253.

3.1.5 Expression von S1P₁ und LPA₁ in Fibroblasten

Die in einem Gewebeschnitt vorhandenen Fibroblasten wurden durch Färbung mit Vimentin-Antikörpern sichtbar gemacht. Es wurden von den Fibroblasten sowohl S1P₁ als auch LPA₁ exprimiert.

Die Intensitäten unterschieden sich dabei von Probe zu Probe deutlich, ebenso wie die Anzahl der Fibroblasten in den verschiedenen Gewebeschnitten.

Im Zytoplasma und der Zellmembran von Fibroblasten wurde S1P₁ exprimiert. LPA₁ wurde in dieser Studie nur sporadisch von Fibroblasten exprimiert. Auch hier fiel wieder die kernständige Lokalisation auf.

Die Expressionsstärke von S1P₁ und LPA₁ unterschied sich zwischen DKMP- und Kontrollgruppe nicht signifikant. Der p-Wert betrug 0,475 für S1P₁. Da die Expression von

LPA₁ in beiden Gruppen nur zwischen "keine Expression" und "schwache Expression" schwankte, wurde hier ganz auf den Chi-Quadrat-Test verzichtet.

In den folgenden 4 Tabellen und Diagrammen werden die Ergebnisse für S1P₁- und LPA₁-Expression in Fibroblasten dargestellt.

Expression		S1P ₁ -Expression in Fibroblasten				Gesamt
		-	+	++	+++	
Diagnose	krank	1	4	3	2	10
	gesund	1	1	5	3	10
Gesamt		2	5	8	5	20

Tabelle 22: Diagnose * S1P₁ in Fibroblasten Kreuztabelle

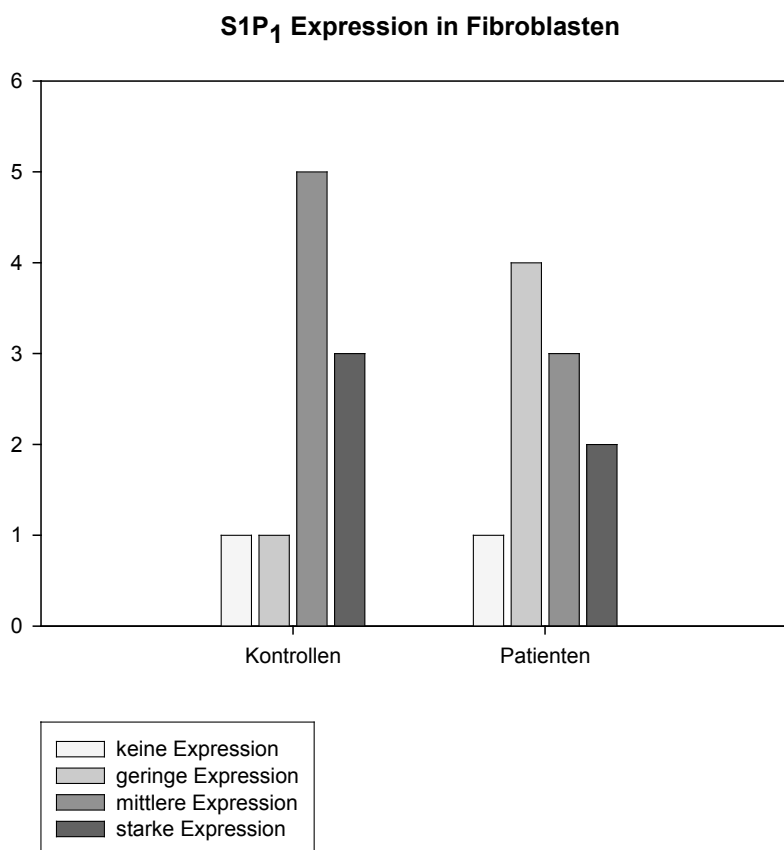
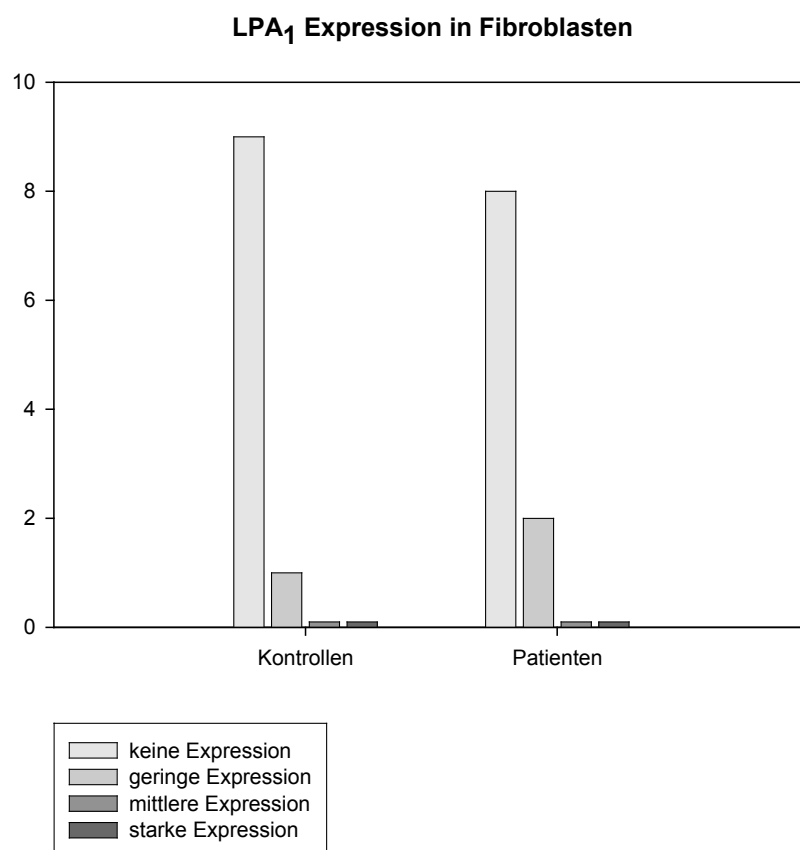


Abbildung 20: S1P₁-Expression in Fibroblasten. Es besteht kein Unterschied zwischen beiden Gruppen in der Expression von S1P₁. $p = 0,475$

Expression		LPA ₁ -Expression in Fibroblasten		Gesamt
		-	+	
Diagnose	krank	8	2	10
	gesund	9	1	10
Gesamt		17	3	20

Tabelle 23: Diagnose * LPA₁ in Fibroblasten KreuztabelleAbbildung 21: LPA₁ Expression in Fibroblasten. Es liegt keine signifikante Regulation des Rezeptors vor.

3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den folgenden Tabellen 24 und 25 werden die Ergebnisse zur Expressionsstärke mit Hilfe der ermittelten p-Werte aus den Chi-Quadrat-Tests sowie das jeweils beobachtete Lokalisationsmuster zusammengefasst. Die signifikanten Regulationen sind dabei rot hervorgehoben.

In dieser Studie wurde eine Korrelation zwischen der S1P₁- und LPA₁-Expressionsstärke und dem Vorliegen einer DKMP gezeigt. Keine Korrelation konnte zwischen Alter oder Geschlecht des Gesamtkollektivs (DKMP und Kontrollen) mit der S1P₁- und LPA₁-Expression nachgewiesen werden.

	Myozyten	Endothelzellen	VSMCs	Fibroblasten
S1P₁	0,040 Patienten ↑	0,112	0,515	0,475
LPA₁	0,155	0,006 Patienten ↑	0,253	--

Tabelle 24: Zusammenstellung der p-Werte des Chi-Quadrat-Tests

	Myozyten	Endothelzellen	VSMCs	Fibroblasten
S1P₁	In Glanzstreifen und zytoplasmatisch/ teilweise membranständig	zytoplasmatisch/ teilweise membranständig und perinukleär	Insgesamt schwach zytoplasmatisch lokalisiert	zytoplasmatisch lokalisiert
LPA₁	Im Kern und schwach zytoplasmatisch	Im Kern und schwach zytoplasmatisch	Im Kern und schwach zytoplasmatisch	Im Kern und schwach zytoplasmatisch

Tabelle 25: Lokalisationsmuster beider Rezeptoren in den verschiedenen Zelltypen

3.2 Ergebnisse des Western Blots

Die LPA₁-Expression im Myokard-Gesamtprotein einer Kontrollgruppe und einer Patientengruppe mit DKMP wurden im Western Blot miteinander verglichen. So konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz überprüft und quantifiziert werden. Es zeigte sich eine ungefähr doppelt so hohe LPA₁-Expression in den Patientenherzen gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Anstieg wurde in zwei unabhängigen Experimenten nachgewiesen, von denen hier eines exemplarisch gezeigt wird. Die entsprechenden Daten für die S1P₁-Expression lagen der Arbeitsgruppe bereits vor (siehe Publ. Becher et al.).

3.2.1 Hybridisierung mit Anti-LPA₁ und Anti-GAPDH auf den Membranen 1 - 4

Bei Hybridisierung mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von LPA₁ traten zwei Banden auf. Die untere, meist etwas stärkere bei lag bei 37 kDa, also der errechneten Größe des Rezeptors. Die größere lag bei 40 kDa. Die Abbildungen 22-29 zeigen die ausgewerteten Doppelbanden der vier Gele sowie die zugehörigen GAPDH-Färbungen jeweils mit Eichgerade und neun Proben im Doppelansatz. Die Aufteilung der Gele ist den Beschriftungen zu entnehmen.

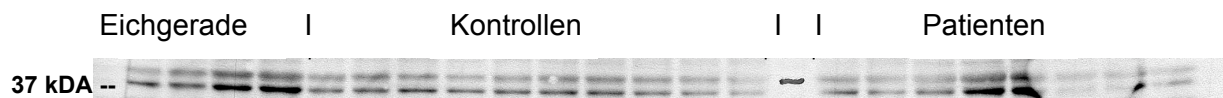


Abbildung 22: Hybridisierung mit Anti-LPA₁ auf Membran 1

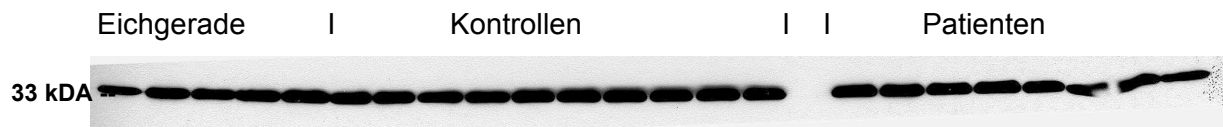


Abbildung 23: Hybridisierung mit Anti-GAPDH auf Membran 1

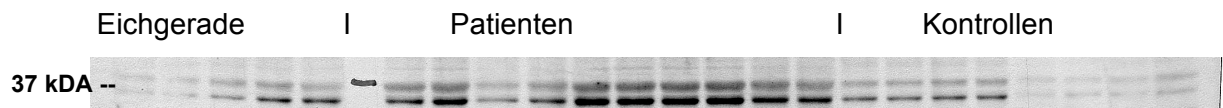


Abbildung 24: Hybridisierung mit Anti-LPA₁ auf Membran 2

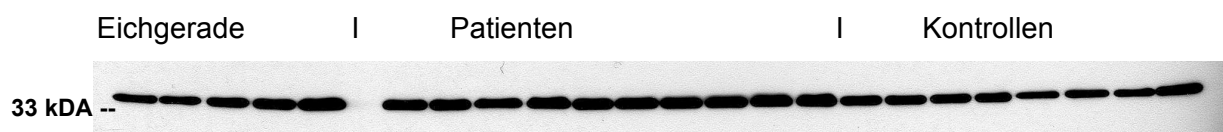


Abbildung 25: Hybridisierung mit Anti-GAPDH auf Membran 2

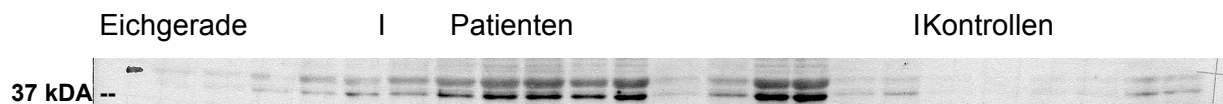


Abbildung 26: Hybridisierung mit Anti-LPA₁ auf Membran 3

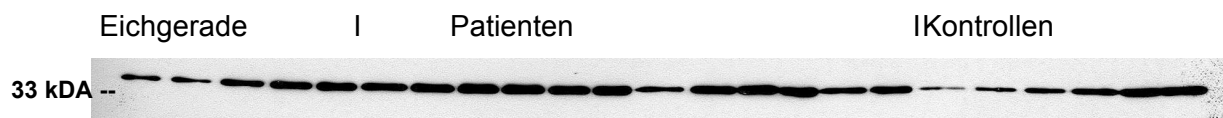


Abbildung 27: Hybridisierung mit Anti-GAPDH auf Membran 3

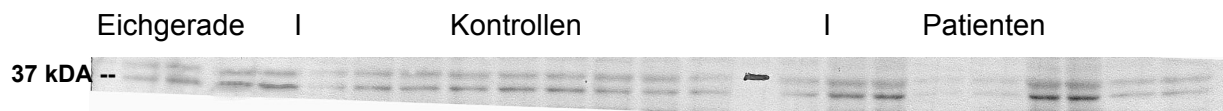


Abbildung 28: Hybridisierung mit Anti-LPA₁ auf Membran 4

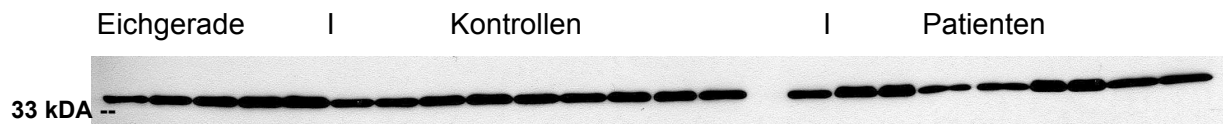


Abbildung 29: Hybridisierung mit Anti-GAPDH auf Membran 4

3.2.2 Berechnung der exprimierten Proteinmengen

In den folgenden Tabellen 26 und 27 werden die aus den Regressionsgeraden errechneten Proteinmengen für LPA₁ und GAPDH in μg je Probe sowie die Quotienten aus beiden aufgeführt. Der Quotient beschreibt die Menge an LPA₁-Protein in jeder Probe bezogen auf die aufgetragene Proteinmenge pro Spur, die leicht variieren kann. Um die Gele auch untereinander vergleichbar zu machen, wurde der Mittelwert der Quotienten aller Kontrollen der vier Gele gleich 100% gesetzt und allen Quotienten entsprechend umgerechnet. Die letzte Spalte zeigt die prozentuale LPA₁-Expression jeder Probe bezogen auf alle Kontrollen.

Probe	Gel 1				Gel 2			
	LPA ₁ in µg	GAPDH in µg	LPA ₁ /GAPDH	Normalisiert auf Kontrollen in %	LPA ₁ in µg	GAPDH in µg	LPA ₁ /GAPDH	Normalisiert auf Kontrollen in %
Pool 5µg	4,49	1,29			6,13	6,29		
Pool 10µg	11,22	14,66			7,28	8,58		
Pool 15µg	12,69	15,52			15,98	15,47		
Pool 20µg	23,04	19,83			21,69	18,17		
Pool 25µg	23,58	23,71			23,92	26,49		
Kontrolle	16,16	15,21	1,06	123,28	13,87	14,50	0,96	117,79
Kontrolle	14,44	16,98	0,85	98,86	15,92	10,15	1,47	180,37
Kontrolle	16,19	17,98	0,9	104,67	0,25	7,73	0,03	3,68
Kontrolle	14,9	17,5	0,85	98,86	1,69	8,89	0,19	23,31
Kontrolle	11,39	17,79	0,64	74,43				
Kontrolle								
Patient	14,36	18,06	0,8	93,04	34,74	20,95	1,66	203,68
Patient	19,44	17,19	1,13	131,42	17,45	23,06	0,76	93,25
Patient	23,5	14,06	1,67	194,22	41,8	17,81	2,35	288,35
Patient	12,99	11,29	1,15	133,75	45,99	18,79	2,45	300,62
Patient					38,96	19,19	2,03	249,08
Patient								

Tabelle 26: Zusammenstellung der errechneten Proteinmengen und Quotienten für LPA₁ und GAPDH in den Proben 1-18. Die letzte Spalte zeigt die prozentuale LPA₁-Expression, bezogen auf die mittlere Expression innerhalb der Kontrollgruppe, die gleich 100% gesetzt wurde.

Probe	Gel 3				Gel 4			
	LPA ₁ in µg	GAPDH in µg	LPA ₁ /GAPDH	Normalisiert auf Kontrollen in %	LPA ₁ in µg	GAPDH in µg	LPA ₁ /GAPDH	Normalisiert auf Kontrollen in %
Pool 5µg	7,12	5,3			3,01	4,59		
Pool 10µg	10,31	7,44			10,03	10,6		
Pool 15µg	10,31	18,49			18,22	15,74		
Pool 20µg	19,97	19,48			21,42	18,36		
Pool 25µg	27,29	24,28			22,32	25,71		
Kontrolle	2,4	2,26	1,06	137,66	16,13	12,68	1,27	125,01
Kontrolle	7,97	14,33	0,56	72,73	19,1	18,72	1,02	100,40
Kontrolle	16,17	23,56	0,69	89,61	18,46	18,53	1	98,43
Kontrolle					15,49	17,23	0,9	88,59
Kontrolle					13,15	14,76	0,89	87,60
Kontrolle								
Patient	44,01	27,18	1,62	210,39	20,32	17,66	1,15	113,19
Patient	72,91	27,48	2,65	344,16	11,67	9,62	1,21	119,10
Patient	65,22	26,02	2,51	325,97	23,00	17,33	1,33	130,91
Patient	25,68	21,26	1,21	157,14	18,74	17,23	1,09	107,29
Patient	82,24	26,31	3,31	429,87				
Patient	16,22	19,47	0,83	107,79				

Tabelle 27: Zusammenstellung der errechneten Proteinmengen und Quotienten für LPA₁ und GAPDH in den Proben 19 -36. Die letzte Spalte zeigt die prozentuale LPA₁-Expression, bezogen auf die mittlere Expression innerhalb der Kontrollgruppe, die gleich 100% gesetzt wurde.

Das Balkendiagramm in Abb. 30 stellt die LPA₁-Expression für die beiden untersuchten Gruppen dar. Die Kontrollgruppe wurde gleich 100% gesetzt. Die Patientengruppe liegt bei etwa 200%. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde eine asymptotische Signifikanz von $P=0,0004$ berechnet. Der Anstieg der LPA₁-Expression in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe ist damit signifikant.

LPA₁-Expression im Myokard-Homogenisat

LPA₁/GAPDH bezogen auf Kontrollen

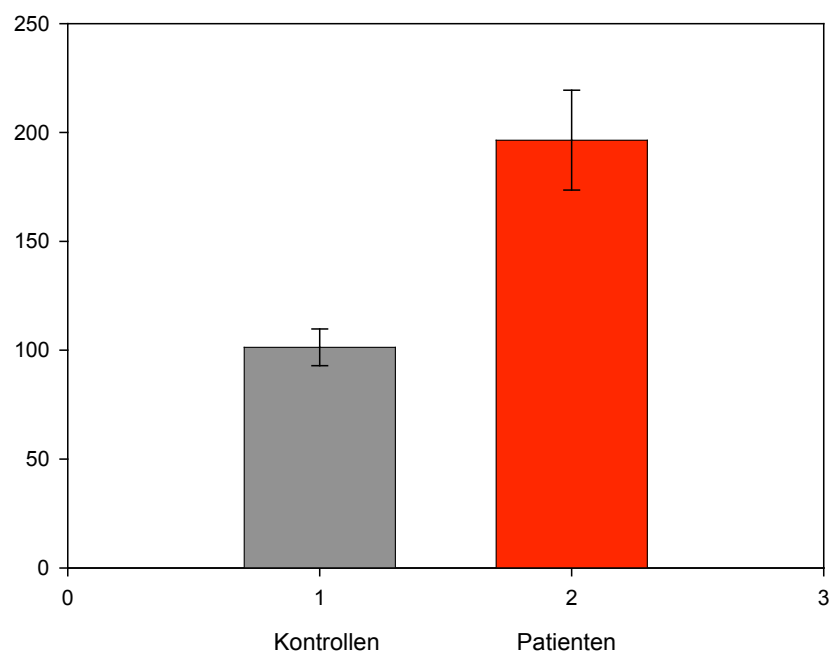


Abbildung 30: LPA₁-Expression in humanem Myokardprotein. Die Expression in den Kontrollherzen wurde auf 100% gesetzt. Die Expression in den Patientenherzen ist stärker und liegt bei fast 200%. Der Unterschied beider Gruppen ist signifikant, der p-Wert ist gleich 0,0004.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden das Expressionsmuster und die Regulation der Rezeptoren LPA₁ und S1P₁ im humanen Myokard untersucht. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, welche der vorkommenden Zellen LPA₁ und S1P₁ exprimieren und wie stark ihre Expression in Myokardproben von DKMP-Patienten und gesunden Spenderherzen ausfällt.

Beide Rezeptoren wurden in dieser Studie im humanen Myokard exprimiert und dort bei dilatativer Kardiomyopathie reguliert. Dabei zeigte sich in den untersuchten Proben eine Hochregulation von S1P₁ in DKMP-Myozyten sowie eine Hochregulation von LPA₁ in kardialen Endothelzellen der DKMP-Patienten. S1P₁ stellte sich dabei membranständig und zytoplasmatisch lokalisiert, LPA₁ kernlokalisiert dar (siehe Kapitel 3.1.6).

4.1.1 Nachweis von S1P₁ und LPA₁ im Myokard mittels Immunfluoreszenz

Eine S1P₁-Expression wurde in fast allen gesunden und kranken Myokardproben beobachtet. Hierbei erfolgte durch Kofärbungen mit verschiedenen Zellmarkern ein Nachweis in Endothelzellen, Myozyten, VSMCs und Fibroblasten. Die Expression variierte je nach Zelltyp: Endothelzellen und Myozyten zeigten eine stärkere Expression als Fibroblasten und VSMCs. Die an DKMP erkrankte Patientengruppe wies darüber hinaus eine stärkere Expression von S1P₁ auf als die Kontrollgruppe, jedoch nur auf bestimmten Zellen. So fand die Hochregulation von S1P₁ hauptsächlich in den Myozyten statt, während die anderen Zellen wenig oder keine Veränderung zeigten. Dies lässt vermuten, dass die funktionelle Bedeutung von S1P₁ im humanen Herzen hauptsächlich für die Myozyten relevant ist. Wie in der Einleitung beschrieben, verursacht S1P₁ vermittelt durch S1P₁ in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten Hypertrophie [35]. Da die Myozyten-Hypertrophie eine wichtige morphologische Veränderung der DKMP darstellt, könnte sie hier im Zusammenhang mit der verstärkten Expression von S1P₁ stehen.

LPA₁ hingegen wurde nur sporadisch in gesunden Spenderherzen exprimiert und bei dilatativer Kardiomyopathie signifikant in den Endothelzellen des Endokards und der kardialen Blutgefäße sowie in geringerem Ausmaß in Myozyten hochreguliert. Diese Beobachtung legte nahe, dass LPA₁-vermittelte Effekte bei DKMP die Endothelzellen und Myozyten betreffen. Diese Beobachtung wird unterstützt durch die Ergebnisse von Panetti et al. [23], nach welchen LPA die Migration von kardialen Endothelzellen von

fetalen Rindern stimuliert. Die durch LPA₁ angestoßenen Signalkaskaden, welche zu Migration, Proliferation und Apoptose führen, könnten während der Umbauprozesse im erkrankten Myokard eine entscheidende Rolle spielen. Glatte Gefäßmuskelzellen und kardiale Fibroblasten exprimierten in dieser Studie nur sporadisch LPA₁, ihr LPA₁-vermittelter Einfluss auf die Manifestation der DKMP ist daher möglicherweise als geringer einzustufen.

Da die signifikante Hochregulation beider Rezeptoren bei DKMP in unterschiedlichen Zelltypen stattfindet, ist hier zusammenfassend von unterschiedlichen Effekten von LPA₁ und S1P₁ auszugehen.

Weiterhin fiel das unterschiedliche Expressionsmuster von LPA₁ und S1P₁ auf. S1P₁ zeigte sich in allen Zelltypen wie erwartet zytoplasmatisch oder Membran-lokalisiert. Überraschenderweise schien jedoch LPA₁ in allen vier Zelltypen im Kern oder der Kernmembran lokalisiert zu sein, was in der Immunfluoreszenz nicht eindeutig zu unterscheiden war. Die mögliche Funktion eines kernlokalisierten GPCRs wurde bisher nicht beschrieben und wird in Kapitel 4.1.3 diskutiert.

Es konnte gezeigt werden, dass S1P₁ und LPA₁ eine krankheitsabhängige Veränderung der Expressionstärke, jedoch keine Veränderung ihrer zellulären Lokalisation zeigen. S1P₁ und LPA₁ wurden also unabhängig davon, ob die Myokardprobe aus einem gesunden oder DKMP-Herzen stammt, immer am selben Ort exprimiert.

4.1.2 Quantifizierung von LPA₁-Protein im Western Blot

Die beobachtete Hochregulierung von LPA₁ wurde anschließend im Western Blot untersucht. Auch hier wurde eine deutliche Steigerung der Expression von LPA₁ in der DKMP-Gruppe gemessen, die gegenüber der Kontrollgruppe fast das Doppelte betrug. Die aufgetretene Doppelbande zeigte zum einen die 37 kD-Bande, welche der errechneten Größe des Rezeptors entspricht. Die etwas höhere, bei 40 kD liegende Bande war zumeist schwächer und unschärfer begrenzt. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür ist die spezifische Anfärbung einer glykosilierten Variante des Rezeptors. Das Vorkommen von Arginin am N-Terminus von LPA₁ weist dabei am ehesten auf eine N-Glykosylierung hin. Unter Einschluss der Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz-Mikroskopie lässt sich vermuten, dass die Hochregulation des LPA₁-Proteins überwiegend aus den Endothelzellen und Myozyten des Myokards stammt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ebenfalls eine signifikante Hochregulierung des S1P₁-Proteins in Western Blot-Analysen gezeigt, was die Immunfluoreszenz-Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen (siehe Publikationen Becher et al.).

4.1.3 Mechanismen der Internalisierung und möglichen nukleären Translokation von Lysophospholipidrezeptoren

In dieser Studie wurde eine Regulation beider Rezeptoren im Herzmuskel bei DKMP nachgewiesen. LPA₁ und S1P₁ kamen nicht, wie bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zunächst erwartet, hauptsächlich in der Zellmembran vor, sondern auch zytoplasmatisch, bzw. kernständig. In der Literatur werden zu diesem Ergebnis passend, mehrere Internalisierungs-Mechanismen beschrieben (siehe Kapitel 1.3.1). Es ist möglich, dass im Serum von DKMP-Patienten veränderte S1P- und LPA-Konzentrationen vorliegen, was einen Einfluss auf die Lokalisation und Expressionsstärke der beiden Rezeptoren haben könnte. Mit der Konzentration im Serum ist auch die Konzentration der Agonisten für S1P₁ und LPA₁ eng verbunden. Die Vermutung liegt daher nahe, dass bei einer Bindung der Agonisten an ihren Rezeptor eine Internalisierung des Rezeptors stattfindet. Dies wurde schon in mehreren Studien für andere Rezeptoren belegt [105, 106]. Der Vorgang der Endozytose konnte für LPA₁ gezeigt werden [76]. Hierbei konnte zum ersten Mal eine von der LPA-Konzentration abhängige Internalisierung des Rezeptors in transfizierten HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) bestätigt werden.

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie von humanen Myokard-Paraffinschnitten konnte in dieser Studie LPA₁ im Zellkern oder der Kernmembran von Myozyten, Endothelzellen, VSMCs und Fibroblasten nachgewiesen werden. Seltener waren eine intrazelluläre oder membranständige Lokalisation nachzuweisen. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Zellmembran für den Nachweis der Immunfluoreszenz durchlässig gemacht wird, um eine Passage der Antikörper und anderen Chemikalien zu ermöglichen. Es wäre denkbar, dass durch diese Schädigung der Membran ein vielleicht nur sehr schwaches Signal verloren ginge. So lässt sich mit dieser Methode nicht sicher ausschließen, dass LPA₁ auch stärker in der Membran lokalisiert sein könnte. Die nukleäre Lokalisation von LPA₁ legt nahe, dass dieser GPCR möglicherweise auch als intrazellulärer Rezeptor fungiert. Eine solche Kernlokalisation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist selten und die Funktion von LPA₁ im Kern weitgehend unbekannt. Der Rezeptor könnte dort durch direkte DNA-Bindung eine Funktion als Transkriptionsfaktor haben. Zudem lässt sich nicht ausschließen, dass eine endogene LPA-

Produktion eine ligandenabhängige Translokation des LPA₁-Rezeptors in den Kern bewirkt.

Eine Kernlokalisierung von LPA₁ konnte in unserer Arbeitsgruppe auch in Zellkulturen von Rattenfibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen aus humanen Herzen sowie mittels Zellfraktionierungsmethoden an HUVECs nachgewiesen werden (siehe Publikationen Becher et al.). Eine nukleäre Lokalisation von LPA₁ wurde auch in der Literatur mehrmals beschrieben. Gobeil et al. wiesen den Rezeptor 2003 in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen des Schweines und in Ratten-Hepatozyten nach, und vermuteten, dass der Zellkern als Organelle in der intrakrinen LPA-Signaltransduktion bei der Regulation von pro-inflammatorischer Genexpression von iNOX und COX-2 eine Rolle spielt [77]. Auch Moughal et al. beschrieben 2004 eine durch die Agonisten NGF und LPA kontrollierte nukleäre Translokation des Rezeptors zusammen mit Tyrosinkinase A-Rezeptoren in Phäochromozytomzellen und vermuteten eine Funktion als Transkriptionsfaktor mit Einfluss auf die Apoptose [78]. Ebenfalls von Moughal et al. wurde für LPA₁ eine Kernlokalisationssequenz entdeckt, welche eine Länge von sechs Aminosäuren aufweisen soll. Keiner der anderen EDG-Rezeptoren besitzt laut Moughals Studie eine solche Kernlokalisationssequenz, was sich mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit deckt, da S1P₁ nie im Zellkern nachgewiesen werden konnte. Um die Kernlokalisationssequenz von LPA₁ zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Sequenzanalyse durchgeführt, die ihr Vorkommen allerdings nicht bestätigen konnte. Dies könnte daran liegen, dass Moughal et al. ein Programm benutzten, welches bereits geringere Übereinstimmungen mit anderen Konsensus-Sequenzen als signifikant erachtet. Die Feststellung, dass LPA₁ eine Kernlokalisationssequenz besitzen könnte, muss zudem wegen der Kürze dieser auftretenden Sequenz in Frage gestellt werden, da sie in der Regel eine Länge von 10-40 Aminosäuren aufweisen. Zudem ist keine weitere Literatur vorhanden, die diese Annahme bestätigt. Es ist daher wahrscheinlicher, dass LPA₁ als Komplex mit einem bisher nicht identifizierten Partnermolekül mit Kernlokalisationssequenz zielgerichtet zum Kern transportiert zu wird, um dort als Regulator bestimmter DNA-Sequenzen zu fungieren.

S1P₁ hingegen wurde membranständig oder häufiger zytoplasmatisch detektiert. Für S1P₁ wird in der Literatur ebenfalls eine Liganden-abhängige Internalisierung beschrieben [107]. Wie die meisten GPCRs wird der Rezeptor posttranslational modifiziert. Eine Möglichkeit ist zum z.B. die Phosphorylierung durch eine GPCR-Kinase. Dadurch wird eine Voraussetzung für die Internalisierung durch Bindung an Arrestine erfüllt [50]. Eine

weitere Möglichkeit besteht in der Glykosylierung des N-Terminus, also des extrazellulären Anteils des Rezeptors, die ebenfalls mit der Internalisierung in Zusammenhang steht [108]. Möglich ist außerdem, dass bei diesem Rezeptor keine zwingende Abhängigkeit der Internalisierung von der Konzentration des Liganden besteht. Zellspezifische Verschiedenheiten spielen hierbei wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle. Wie für S1P₁ ist auch für LPA₁ ein Zusammenhang zwischen der Glykosylierung und der Internalisierung des Rezeptors möglich. Die im Western Blot gezeigte Doppelbande für LPA₁ könnte ein Hinweis darauf sein, dass neben dem Rezeptor mit dem errechneten Molekulargewicht bei 37 kDa noch eine glykosylierte Form vorliegt.

4.2 Funktion der Hochregulation von S1P₁ und LPA₁ bei DKMP

In dieser Studie wurde eine Hochregulation für S1P₁- und LPA₁-Protein im humanen Myokard bei DKMP gezeigt. Deutlich wurde ebenfalls, in welchen Zellen diese Regulation überwiegend stattfindet.

Die Regulation könnte mit den pathologischen Veränderungen des Myokards im Zusammenhang stehen, welche in Kapitel 1.4.1 und 1.4.5 erläutert wurden. Ein wichtiger Faktor ist die Myozytenhypertrophie. LPA verursachte in Versuchen an neonatalen Rattenmyozyten eine Zellhypertrophie über einen LPA₁- und Rac-abhängigen Mechanismus, indem es Einfluss auf die damit verbundene Protein-Synthese und Organisation von Actin-Filamenten nimmt [70], was im Zusammenhang mit der in Kapitel 4.1.3 diskutierten Kernlokalisation und Funktion als Transkriptionsfaktor von LPA₁ stehen könnte. Auch S1P ist an der Entstehung von Myozytenhypertrophie beteiligt [35].

Die in dieser Studie erhöhte Expression von S1P₁ im erkrankten Myokard ließe sich außerdem vereinbaren mit dem Verlust von Myofibrillen bei DKMP durch Apoptose, welche durch S1P beeinflusst wird.

Ein Zusammenhang mit der entzündlichen und autoimmunologischen Genese der DKMP ist ebenfalls denkbar, da LPA und S1P die Immunantwort regulieren, indem sie die Lymphozytenaktivität beeinflussen [109, 110]. Eine vermehrte Expression beider Rezeptoren könnte also Folge oder auch Ursache der begleitenden entzündlichen Prozesse sein. Die von Gobeil 2002 nachgewiesene Modulation der COX-2 Gentranskription durch einen nukleären LPA₁-Rezeptor in Endothelzellen von Schweinen [77] lässt vermuten, dass auch die Hochregulation von LPA₁ im Kern humaner kardialer Endothelzellen mit inflammatorischer Genexpression zusammenhängen könnte.

Der bei DKMP häufig erhöhte BNP-Serumspiegel könnte ebenfalls mit der verstärkten LPA₁-Expression der kardialen Endothelzellen zusammenhängen, da LPA einen BNP-Promoter stimuliert [111].

Da mit zunehmender Herzinsuffizienz bei DKMP-Patienten der Catecholaminspiegel im Blut steigt, könnte es sich bei der vermehrten LPA₁-Expression der Endothelzellen um einen Schutzmechanismus handeln, da LPA durch die Aufhebung der Isoprenalin-Wirkung eine antiadrenerge Wirkung auf das Myokard ausübt [45]. Denkbar wäre, dass das Herz auf diese Weise vor den positiv ino-, dromo- und chronotropen Einflüssen der Catecholamine geschützt wird.

4.3 Ausblick

Mit Blick auf die Relevanz der EDG-Rezeptoren LPA₁ und S1P₁ für das kardiovaskuläre System und seine Erkrankungen ist es von besonderem Interesse, ihre Funktionsweisen genauer zu untersuchen. Weiterführende Untersuchungen könnten dahingehend verlaufen, die Effekte von EDG-Signaltransduktionen bei Herzerkrankungen genauer zu studieren, um ihnen auf diese Weise eine kardioprotektive oder schädigende Beteiligung zuordnen zu können. Von Interesse ist außerdem, ob diese Effekte ausschließlich über die beiden hier untersuchten Rezeptoren oder aber durch intrazelluläre Wirkung von S1P und LPA oder auch über andere EDG-Rezeptoren hervorgerufen werden können. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnten Moleküle mit agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung für die Rezeptoren LPA₁ und S1P₁ entwickelt werden, die Einfluss auf den pathologischen Umbau des Myoards durch entzündliche Prozesse und Hypertrophie nehmen, oder Herzmuskelzellen vor den Einflüssen adrenerger Substanzen schützen könnten. Durch solche Substanzen könnten Therapiekonzepte für DKMP-Patienten ergänzt werden, welche neben der Herzinsuffizienz als Folge der DKMP auch die Pathogenese der Erkrankung beeinflussen könnten, wie es z.B. mit Immunsuppressiva bereits versucht wird. Als ein weiteres mögliches Einsatzgebiet von LPA₁- und S1P₁-Agonisten/Antagonisten wäre die Immunsuppression bei transplantierten DKMP-Patienten denkbar. Es existiert für andere Anwendungsgebiete bereits ein phosphorylierter Metabolit von FTY720, welcher alle S1P-Rezeptoren agonisiert [112-114]. Es handelt sich dabei um ein neuartiges Immunsuppressivum, welches ein „homing“ der Lymphozyten verursacht und so Transplantatschäden durch T-Zellen verhindert, jedoch nicht die generelle immunologische Antwort auf Antigene beeinträchtigt.

Die in dieser Arbeit beschriebene Besonderheit der Kernlokalisierung von LPA₁ könnte Grundlage weiterer Untersuchungen sein. Als mögliche Funktion des GPCR im Kern käme seine Wirkung als Transkriptionsfaktor in Frage. Falls LPA₁ dafür selbst an DNA-regulative Elemente bindet, könnten diese isoliert und anschließend identifiziert werden. Mögliche Mechanismen oder Partnerproteine, mit denen LPA₁ in den Kern gelangt, wären zu identifizieren. Hierbei könnten mittels Immunoprecipitation potenzielle Partnermoleküle gefunden und durch Sequenzierung identifiziert werden.

Der in dieser Studie beschriebene zytoplasmatische S1P₁-Rezeptor könnte hinsichtlich seiner genauen zellulären Lokalisation, z.B. bestimmten Zellorganellen zugeordnet, untersucht werden, was weitere Rückschlüsse auf seine Funktion zulassen würde.

5. Zusammenfassung

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 Inflammation, Zell-Apoptose und -Migration haben und an der Kardioprotektivität während Ischämie und der Entstehung von Hypertrophie der Herzmuskelzellen beteiligt sind. Diese Prozesse haben eine große Bedeutung für die Entstehung der DKMP. Viele Effekte, die von LPA und S1P ausgehen, werden über die acht G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der EDG-Familie vermittelt.

In dieser Arbeit wurde linksventrikuläres Gewebe aus humanen Herzen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blots hinsichtlich der Expressionsstärke und Lokalisation der GPCRs S1P₁ und LPA₁ untersucht. Dabei sollte die zelluläre Lokalisation und Stärke der Expression in Herzen von DKMP-Patienten mit der von gesunden Spenderherzen verglichen werden. Das kardiale Gewebe setzt sich aus Myozyten, Endothelzellen der Blutgefäße und des Endokards, Fibroblasten, sowie den VSMCs der Blutgefäße zusammen.

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie von 20 Proben ergab, dass S1P₁ und LPA₁ von kardialen Endothelzellen, Fibroblasten, VSMCs und Myozyten exprimiert wurden. In DKMP-Proben konnte eine Hochregulation der Rezeptoren für zwei Zelltypen nachgewiesen werden. Signifikant waren die Hochregulation von LPA₁ in den kardialen Endothelzellen und von S1P₁ in den Kardiomyozyten in der Patientengruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Für die Western Blots wurden Proteine aus linksventrikulären Gewebeproben von 36 humanen Herzen isoliert und auf ihre LPA₁-Expression hin untersucht. In der DKMP-Gruppe zeigte sich eine zweifach erhöhte LPA₁-Expression gegenüber der Kontrollgruppe.

Zudem konnte ein Unterschied im zellulären Expressionsmuster von S1P₁ und LPA₁ gezeigt werden, wonach S1P₁ meist eine zytoplasmatische oder membranständige und LPA₁ eine Kern- oder Kernmembran-Lokalisation in den untersuchten Zellen aufwies. Eine Kern-Translokation ist für einen GPCR wie LPA₁ ungewöhnlich und die Funktion bisher unbekannt. In der Literatur ist ein nukleärer LPA₁-Rezeptor jedoch schon in den Ratten-Tumorzellen PC12 und HCT4 sowie in mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Gehirn des Schweines beschrieben worden.

Da die Regulation der beiden Lysophospholipid-Rezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen wurde, ist von einem Funktionsunterschied auszugehen, was die Zielzellen der Signaltransduktion betrifft.

Es könnte es sich bei der verstärkten S1P₁-Expression bei DKMP um einen Schutzmechanismus der Myozyten vor den positiv ino-, dromo- und chronotropen Einflüssen der Catecholamine handeln. Die Regulation beider Rezeptoren könnte auch mit dem Umbau des Myokards, insbesondere der Myozyten-Hypertrophie und -Apoptose im Zusammenhang stehen. Außerdem wäre eine Beteiligung der Lysophospholipide und ihrer Rezeptoren für die an der DKMP beteiligte Entzündungsreaktion im erkrankten Herzen denkbar.

Die DKMP stellt zur Zeit die häufigste Ursache schwerer Herzinsuffizienz bei jungen Erwachsenen dar und ist bisher überwiegend durch eine symptomatische Therapie sowie die Herztransplantation behandelbar. Eine genauere Kenntnis der Bedeutung der Lysophospholipid-Rezeptoren für das Herz-Kreislaufsystem könnte für die Entwicklung einer erweiterten medikamentösen Therapie der DKMP von Bedeutung sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Fukushima, N., et al., *Lysophospholipid receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 507-34.
2. Chun, J., et al., *International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 265-9.
3. Hla, T. and T. Maciag, *Isolation of immediate-early differentiation mRNAs by enzymatic amplification of subtracted cDNA from human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **167**(2): p. 637-43.
4. Masana, M.I., et al., *Cloning and characterization of a new member of the G-protein coupled receptor EDG family*. Receptors Channels, 1995. **3**(4): p. 255-62.
5. Hecht, J.H., et al., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1071-83.
6. An, S., et al., *Molecular cloning of the human EDG2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(3): p. 619-22.
7. Lee, M.J., et al., *Lysophosphatidic acid stimulates the G-protein-coupled receptor EDG1 as a low affinity agonist*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 22105-12.
8. Zondag, G.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor EDG1*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 2): p. 605-9.
9. Goetzl, E.J. and S. An, *Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. Faseb J, 1998. **12**(15): p. 1589-98.
10. Gerrard, J.M., et al., *Lysophosphatidic acids. Influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux*. Am J Pathol, 1979. **96**(2): p. 423-38.
11. Moolenaar, W.H., *Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **905**: p. 1-10.
12. Tokumura, A., K. Fukuzawa, and H. Tsukatani, *Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species*. Lipids, 1978. **13**(8): p. 572-4.
13. Tokumura, A., et al., *Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregant rats*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1980. **245**(1): p. 74-83.
14. Pyne, S. and N. Pyne, *Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors*. Pharmacol Ther, 2000. **88**(2): p. 115-31.
15. Luquain, C., V.A. Sciorra, and A.J. Morris, *Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(7): p. 377-83.
16. Karliner, J.S., *Lysophospholipids and the cardiovascular system*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 216-21.
17. Eichholtz, T., et al., *The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets*. Biochem J, 1993. **291** (Pt 3): p. 677-80.
18. Jalink, K., W.H. Moolenaar, and B. Van Duijn, *Lysophosphatidic acid is a chemoattractant for Dictyostelium discoideum amoebae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1857-61.
19. Motohashi, K., et al., *Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate*. FEBS Lett, 2000. **468**(2-3): p. 189-93.

20. Spiegel, S. and S. Milstien, *Sphingolipid metabolites: members of a new class of lipid second messengers*. J Membr Biol, 1995. **146**(3): p. 225-37.
21. Pages, C., et al., *Lysophosphatidic acid synthesis and release(1)*. Prostaglandins, 2001. **64**(1-4): p. 1-10.
22. Okajima, F., *Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator?* Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 132-7.
23. Panetti, T.S., *Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 190-6.
24. Yatomi, Y., et al., *Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum*. J Biochem (Tokyo), 1997. **121**(5): p. 969-73.
25. Lee, M.J., et al., *Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate*. Cell, 1999. **99**(3): p. 301-12.
26. Wang, F., et al., *Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35343-50.
27. English, D., et al., *Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis*. Faseb J, 2000. **14**(14): p. 2255-65.
28. Paik, J.H., et al., *Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 11830-7.
29. Schulze, C., et al., *Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells*. J Neurochem, 1997. **68**(3): p. 991-1000.
30. Ghosh, T.K., J. Bian, and D.L. Gill, *Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium*. J Biol Chem, 1994. **269**(36): p. 22628-35.
31. Kimura, T., et al., *Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, EDG1 and EDG-3*. Biochem J, 2000. **348 Pt 1**: p. 71-6.
32. Takuwa, Y., N. Takuwa, and N. Sugimoto, *The EDG family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities*. J Biochem (Tokyo), 2002. **131**(6): p. 767-71.
33. Hisano, N., et al., *Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4293-9.
34. Karliner, J.S., et al., *The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(9): p. 1713-7.
35. Robert, P., et al., *EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(9): p. 1589-606.
36. Bischoff, A., et al., *Sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine constrict renal and mesenteric microvessels in vitro*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(8): p. 1871-7.

37. Kupperman, E., et al., *A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development*. *Nature*, 2000. **406**(6792): p. 192-5.
38. Hornuss, C., et al., *Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG receptors*. *Eur J Pharmacol*, 2001. **429**(1-3): p. 303-8.
39. Mazurais, D., et al., *Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**(5): p. 661-70.
40. Baker, D.L., et al., *Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2001. **292**(2): p. 287-95.
41. Levine, J.S., et al., *Lysophosphatidic acid: a novel growth and survival factor for renal proximal tubular cells*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(4 Pt 2): p. F575-85.
42. Koh, J.S., et al., *Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(4): p. 716-27.
43. Tigyi, G., et al., *Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets*. *Am J Physiol*, 1995. **268**(5 Pt 2): p. H2048-55.
44. Yakubu, M.A., et al., *Role of lysophosphatidic acid in endothelin-1- and hematoma-induced alteration of cerebral microcirculation*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(2 Pt 2): p. R703-9.
45. Cremers, B., et al., *Modulation of myocardial contractility by lysophosphatidic acid (LPA)*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(1): p. 71-80.
46. Siess, W., et al., *Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(12): p. 6931-6.
47. Lee, H., E.J. Goetzl, and S. An, *Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. **278**(3): p. C612-8.
48. Van Brocklyn, J.R., et al., *Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor EDG1 and intracellular to regulate proliferation and survival*. *J Cell Biol*, 1998. **142**(1): p. 229-40.
49. Kimura, T., et al., *High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1283-8.
50. Ferguson, S.S., *Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling*. *Pharmacol Rev*, 2001. **53**(1): p. 1-24.
51. Neer, E.J., *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 249-57.
52. Kostenis, E., *Novel clusters of receptors for sphingosine-1-phosphate, sphingosylphosphorylcholine, and (lyso)-phosphatidic acid: new receptors for "old" ligands*. *J Cell Biochem*, 2004. **92**(5): p. 923-36.
53. An, S., et al., *Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(14): p. 7906-10.
54. Yamaguchi, F., et al., *Molecular cloning of the novel human G protein-coupled receptor (GPCR) gene mapped on chromosome 9*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **227**(2): p. 608-14.
55. Moolenaar, W.H., L.A. van Meeteren, and B.N. Giepmans, *The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling*. *Bioessays*, 2004. **26**(8): p. 870-81.

56. Chuprun, J.K., J.R. Raymond, and P.J. Blakeshear, *The heterotrimeric G protein G alpha i2 mediates lysophosphatidic acid-stimulated induction of the c-fos gene in mouse fibroblasts*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 773-81.
57. Crespo, P., et al., *Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits*. Nature, 1994. **369**(6479): p. 418-20.
58. Gaits, F., et al., *G-protein beta gamma subunits mediate specific phosphorylation of the protein-tyrosine phosphatase SH-PTP1 induced by lysophosphatidic acid*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20151-5.
59. Howe, L.R. and C.J. Marshall, *Lysophosphatidic acid stimulates mitogen-activated protein kinase activation via a G-protein-coupled pathway requiring p21ras and p74raf-1*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 20717-20.
60. Spiegel, S. and A.H. Merrill, Jr., *Sphingolipid metabolism and cell growth regulation*. Faseb J, 1996. **10**(12): p. 1388-97.
61. Berridge, M.J., M.D. Bootman, and H.L. Roderick, *Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(7): p. 517-29.
62. Peyruchaud, O. and D.F. Mosher, *Differential stimulation of signaling pathways initiated by EDG2 in response to lysophosphatidic acid or sphingosine-1-phosphate*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(7): p. 1109-16.
63. Swarthout, J.T. and H.W. Walling, *Lysophosphatidic acid: receptors, signaling and survival*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(13-14): p. 1978-85.
64. Fromm, C., et al., *The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and Galpha12 to the serum response element and to cellular transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10098-103.
65. Gohla, A., R. Harhammer, and G. Schultz, *The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4653-9.
66. Hart, M.J., et al., *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13*. Science, 1998. **280**(5372): p. 2112-4.
67. Postma, F.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor*. Embo J, 1996. **15**(10): p. 2388-92.
68. Tigyi, G. and R. Miledi, *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21360-7.
69. Xu, J., et al., *TRIP6 enhances lysophosphatidic acid-induced cell migration by interacting with the lysophosphatidic acid 2 receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10459-68.
70. Hilal-Dandan, R., et al., *Lysophosphatidic acid induces hypertrophy of neonatal cardiac myocytes via activation of Gi and Rho*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(4): p. 481-93.
71. von Zastrow, M., *Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway*. Life Sci, 2003. **74**(2-3): p. 217-24.
72. Pippig, S., S. Andexinger, and M.J. Lohse, *Sequestration and recycling of beta 2-adrenergic receptors permit receptor resensitization*. Mol Pharmacol, 1995. **47**(4): p. 666-76.
73. Pitcher, J.A., et al., *The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8343-7.
74. Koenig, J.A. and J.M. Edwardson, *Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(8): p. 276-87.

75. Tsao, P., T. Cao, and M. von Zastrow, *Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(2): p. 91-6.
76. Murph, M.M., et al., *Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 10): p. 1969-80.
77. Gobeil, F., Jr., et al., *Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38875-83.
78. Moughal, N.A., et al., *Nerve growth factor signaling involves interaction between the Trk A receptor and lysophosphatidate receptor 1 systems: nuclear translocation of the lysophosphatidate receptor 1 and Trk A receptors in pheochromocytoma 12 cells*. Cell Signal, 2004. **16**(1): p. 127-36.
79. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 841-2.
80. Ferrans, V.J., *Pathologic anatomy of the dilated cardiomyopathies*. Am J Cardiol, 1989. **64**(6): p. 9C-11C.
81. Pfreundschuh, M., *Pathophysiologie-Pathobiochemie*. 2000: Urban und Fischer.
82. Dec, G.W. and V. Fuster, *Idiopathic dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 1994. **331**(23): p. 1564-75.
83. Manolio, T.A., et al., *Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop)*. Am J Cardiol, 1992. **69**(17): p. 1458-66.
84. Keogh, A.M., D.W. Baron, and J.B. Hickie, *Prognostic guides in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy assessed for cardiac transplantation*. Am J Cardiol, 1990. **65**(13): p. 903-8.
85. Kienzle, M.G., et al., *Clinical, hemodynamic and sympathetic neural correlates of heart rate variability in congestive heart failure*. Am J Cardiol, 1992. **69**(8): p. 761-7.
86. Maeda, K., et al., *High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(5): p. 1587-93.
87. Roig, E., et al., *Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure*. Eur Heart J, 2000. **21**(1): p. 53-7.
88. Mestroni, L., et al., *Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy*. Am J Cardiol, 1990. **65**(22): p. 1449-53.
89. Thierfelder, L., *[Genetics of dilated cardiomyopathy]*. Med Klin (Munich), 1998. **93**(4): p. 210-4.
90. Hufnagel, G., et al., *The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results*. Herz, 2000. **25**(3): p. 279-85.
91. Kuhl, U., et al., *Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy*. Heart, 1996. **75**(3): p. 295-300.
92. Kandolf, R., *[Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy]*. Med Klin (Munich), 1998. **93**(4): p. 215-22.
93. Pankuweit, S., et al., *[Cardiotropic DNA viruses and bacteria in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy with or without inflammation]*. Med Klin (Munich), 1998. **93**(4): p. 223-8.

94. Cetta, F. and V.V. Michels, *The autoimmune basis of dilated cardiomyopathy*. Ann Med, 1995. **27**(2): p. 169-73.
95. Matsui, S. and M.L. Fu, *Myocardial injury due to G-protein coupled receptor-autoimmunity*. Jpn Heart J, 1998. **39**(3): p. 261-74.
96. Matsumori, A., *Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies*. Curr Opin Cardiol, 1996. **11**(3): p. 302-9.
97. Torre-Amione, G., et al., *Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1201-6.
98. Cain, B.S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function*. Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1309-18.
99. Plenz, G., et al., *Left-ventricular expression of interleukin-6 messenger-RNA higher in idiopathic dilated than in ischemic cardiomyopathy*. Thorac Cardiovasc Surg, 1998. **46**(4): p. 213-6.
100. Torre-Amione, G., M.T. Vooletich, and J.A. Farmer, *Role of tumour necrosis factor-alpha in the progression of heart failure: therapeutic implications*. Drugs, 2000. **59**(4): p. 745-51.
101. Gulick, T., et al., *Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6753-7.
102. Hambrecht, R., et al., *Physical training in patients with stable chronic heart failure: effects on cardiorespiratory fitness and ultrastructural abnormalities of leg muscles*. J Am Coll Cardiol, 1995. **25**(6): p. 1239-49.
103. Hosenpud, J.D., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000*. J Heart Lung Transplant, 2000. **19**(10): p. 909-31.
104. Contos, J.J., I. Ishii, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid receptors*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(6): p. 1188-96.
105. Keith, D.E., et al., *mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(3): p. 377-84.
106. Kurz, J.B. and J.P. Perkins, *Isoproterenol-initiated beta-adrenergic receptor diacytosis in cultured cells*. Mol Pharmacol, 1992. **41**(2): p. 375-81.
107. Kohno, T., A. Wada, and Y. Igarashi, *N-glycans of sphingosine 1-phosphate receptor EDG1 regulate ligand-induced receptor internalization*. Faseb J, 2002. **16**(9): p. 983-92.
108. Kaushal, S., K.D. Ridge, and H.G. Khorana, *Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 4024-8.
109. Goetzl, E.J. and M.H. Graler, *Sphingosine 1-phosphate and its type 1 G protein-coupled receptor: trophic support and functional regulation of T lymphocytes*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 30-5.
110. Goetzl, E.J., et al., *Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system*. J Cell Biochem, 2004. **92**(6): p. 1104-14.
111. He, Q. and M.C. LaPointe, *Src and Rac mediate endothelin-1 and lysophosphatidic acid stimulation of the human brain natriuretic peptide promoter*. Hypertension, 2001. **37**(2 Part 2): p. 478-84.
112. Brinkmann, V., et al., *The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21453-7.

113. Brinkmann, V. and K.R. Lynch, *FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(5): p. 569-75.
114. Rosen, H., G. Sanna, and C. Alfonso, *Egress: a receptor-regulated step in lymphocyte trafficking*. *Immunol Rev*, 2003. **195**: p. 160-77.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in verschiedener Form veröffentlicht:

“EDG1 und EDG2 in Herz-Kreislaufkrankungen – Krankheits und Zellspezifische Regulation”

Busch J, Becher E, Weissbach J, Stuke T, Steege A, Dedio J, Regitz-Zagrosek V.
Poster für Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie, April 2005

“Increased expression of EDG-Receptors S1P₁ and LPA₁ in patients with dilated cardiomyopathy“

Becher E, Weissbach J, Busch J, Stuke T, Steege A, Efferts K, Pregla R, Hetzer R, Regitz Zagrosek V.

Eingereicht im „Journal of molecular and cellular cardiology“, Juli 2007

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Vera Regitz-Zagrosek für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, sie in ihrem Labor durchzuführen sowie die wissenschaftliche Ausbildung im Center for Cardiovascular Research.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Eva Becher, die meine Arbeit im Labor täglich sowohl praktisch als auch inhaltlich unterstützte und mir eine großen Hilfe war. Weiter möchte ich mich bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mir mit inhaltlicher Hilfe sowie bei der Einarbeitung im Labor zur Seite standen, insbesondere bei bei Frau Britta Hannack, Jenny Thomas und Anja Angelov.

Die Dissertation entstand im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe Regitz-Zagrosek mit der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH.

Erklärung

„Ich, Julia Weißbach, geboren am 8. September 1979 in Berlin, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema “Lokalisation und Regulierung der Endothel-Differenzierungs-Gen-Rezeptoren S1P₁ und LPA₁ in humanen Myokardproben“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift