

**Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin**

Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Endokrinologie Diabetes und Ernährungsmedizin
Direktor: Professor Dr. Andreas F. H. Pfeiffer

THEMA

„Die Regulation von uPAR durch metabolische Faktoren in vivo und in
vitro“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Anke Aßmann
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. J. Spranger

Korreferent: Prof. Dr. F. J. Schweigert

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 19.09.2008

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS	3
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	6
III ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	9
1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	11
2. LITERATURÜBERSICHT.....	13
2.1. Arteriosklerose	13
2.1.1. Definition und Prävalenz.....	13
2.1.2. Pathogenese	13
2.2.1. Der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor (uPAR, CD87).....	18
2.2.2. uPA.....	19
2.2.3. Plasmin	20
2.3. Weitere Liganden des uPAR	22
2.3.1. Integrine.....	22
2.3.2. Vitronektin.....	23
2.3.3. Sonstige Liganden	24
2.4. Signaltransduktion und transmembrane Adaptoren	24
2.4.1. PKC	24
2.4.2. NRTK (Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen)	25
2.4.3. Integrine und Signaltransduktion	25
2.4.4. Caveolin.....	25
2.4.5. Gp130	26
2.5. Die Bedeutung des uPAR bei der Atheroskleroseentstehung	27
3. MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1. Material	29
3.1.1. Chemikalien.....	29
3.1.2. Biochemikalien.....	30
3.1.3. Verbrauchsmittel	32
3.1.4. Geräte	32
3.1.5. Software.....	33

3.2. Methoden.....	34
3.2.1. Funktionelle Studien.....	34
3.2.1.1. Zellkultur.....	34
3.2.1.1.1. Herstellen von gestripptem Serum.....	34
3.2.1.1.2. Herstellung der Fettsäuren.....	35
3.2.1.1.3. Entfetten von BSA.....	35
3.2.1.1.4. Auflösung der Fettsäuren.....	36
3.2.2. Aufbereitung der Proben.....	37
3.2.2.1. In vitro Probengewinnung.....	37
3.2.2.2. In vivo Monozytenpräparation.....	37
3.2.3. RNA-Extraktion.....	39
3.2.3.1. Bestimmung der RNA-Konzentration.....	40
3.2.4. Real - Time - PCR.....	41
3.2.4.1. uPAR-PCR.....	44
3.2.4.2. Tubulin-PCR.....	44
3.2.4.4. Kontrolle der PCR.....	46
3.2.4.4.1. Agarosegelelektrophorese.....	49
3.2.5. Proteinextraktion.....	51
3.2.5.2. Vorbereitung der Proteinproben:.....	53
3.2.5.6. Analyse der Signalintensitäten.....	59
3.2.6.6. Kontrolle des Western Blot.....	60
3.2.7. Statistische Auswertung.....	61
4. ERGEBNISSE.....	62
4.1. Freie Fettsäuren steigern die Bildung von uPAR.....	62
4.2. Freie Fettsäuren steigern die uPAR-Expression zeitabhängig.....	64
4.3. Freie Fettsäuren steigern die uPAR-Expression konzentrations-abhängig.....	65
4.4. Rosiglitazon senkt die durch Palmitinsäure hervorgerufene uPAR-Expression auf mRNA-Ebene.....	66
4.6. Die Expressionssteigerung des uPAR durch freie Fettsäuren erfolgt unabhängig des PKC Signalweges.....	70
4.7. Die Hemmung des p38 MAPK-Signalweges hebt die fettsäureinduzierte uPAR-Expressionssteigerung auf mRNA-Ebene auf.....	73
4.8. Die akute Regulation des uPAR durch freie Fettsäuren in vitro.....	74

4.9. Die akute Regulation des uPAR durch freie Fettsäuren in vivo.....	75
4.10. uPAR-Effekte als Ergebnis einer gesteigerten Metabolisierung.....	75
4.11. Komponenten der β -Oxidation unter dem Einfluß von freien Fettsäuren.....	76
5. DISKUSSION	78
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	87
7. QUELLENVERZEICHNIS	89
8. ANHANG	99
8.1. Danksagung.....	99
8.2. Erklärung.....	100
8.3. Lebenslauf.....	101

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATF	Aminoterminales Fragment
ATP	Adenosintriphosphat
Bisacrylamid	N, N'-Methylene-bis-Acrylamide
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
ddH ₂ O	Wasser bidestilliert (Reinstwasser)
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP's	2'-Desoxy- Nukleosidtriphosphat
ds	double stranded (doppelsträngig)
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular matrix
EDTA (Titriplex III)	Ethylendinitroltetraessigsäure
Eisessig	Essigsäure 100%
engl.	Englisch
ERK	Extracellular Signal-related Kinase
et al.	et aliis (<i>lat.: und andere</i>)
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Foetal Calf Serum
FFA	free fatty acids
FGF	fibroblast growth factor

FS	Fettsäuren
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²), bzw. Gramm gemäß logischem Zusammenhang
GFX	GF 109203X, Bisindolylmaleimide I
Gp	glycoprotein
GPI	Glycophosphotidylinositol
Grb	Growth-Factor Binding Protein
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethanesulfonsäure)
HGF	hepatocyte growth factor
huPAR	humaner uPAR
IGF	Insulin-like growth factor
Il	Interleukin
IU	International Unit
JAK	Janus Kinase (Just Another Kinase)
JNK	c-Jun NH(2)-terminale Protein Kinase
kDa	Kilo Dalton
LDL	low-density lipoprotein
MAP	Mitogen Activated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
min.	Minute(n)
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger ribonucleic acid
NEFA	non esterified fatty acids
NFκB	Nukleärer Faktor Kappa B
NRTK	Nicht Rezeptor Tyrosinkinasen
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	platelet derived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

PN-1	Protease Nexin 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SB 202190	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH2	Src homology 2
Shc	Src homology/collagen protein
SOS	Son of sevenless
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS-T	Tris Buffered Saline plus Tween™
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
tPA	Tissue-Typ Plasminogen Aktivator
Tris-Base	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylene Glycol Tert-Octylphenyl Ether
TWEEN 20	Polyethylen Glycol Sorbitol Monolaurat
U	Unit (engl. Einheit)
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor
Vn	Vitronektin

III ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1.	Darstellung der wichtigsten durch uPAR aktivierten Signalwege	24
Abb. 3.1.	Sequenzen der verwendeten Primer	44
Abb. 3.2.	Darstellung des spezifischen Schmelzpunktes des amplifizierten uPAR-cDNA-Fragmentes	45
Abb. 3.3.	Darstellung des spezifischen Schmelzpunktes des amplifizierten Tubulin-cDNA-Fragmentes	45
Abb. 3.4.	Verdünnungsreihe uPAR	46
Abb. 3.5.	Verdünnungsreihe Tubulin	47
Abb. 3.6.	Darstellung des typischen 164bp große uPAR-cDNA Fragmentes nach Auftrennung in einer 1%igen Agarosegelmatrix, gefärbt mit Ethidiumbromid	49
Abb. 3.7.	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus beim semi dry blotting	55
Abb. 3.8.	Darstellung der Proteinstandreihe mit rekombinantem huPAR	58
Abb. 3.9.	Kompetition der spezifischen uPAR-Signale	59
Abb. 4.1a	Freie Fettsäuren stimulieren die uPAR Expression auf mRNA-Ebene	60
Abb. 4.1b	Freie Fettsäuren stimulieren die uPAR-Bildung auf Proteinebene	61
Abb. 4.2.	Palmitat stimuliert die uPAR-mRNA-Expression zeitabhängig	62
Abb. 4.3a	Palmitat reguliert die uPAR-mRNA-Bildung konzentrationsabhängig.	63
Abb. 4.3b	Die Regulation der uPAR-Proteinsynthese durch Palmitat ist konzentrationsabhängig.	64
Abb. 4.4.	Rosiglitazon hebt die Effekte von Palmitat auf mRNA-Ebene auf	65
Abb. 4.5a	PPAR γ und PGC1 werden durch freie Fettsäuren reguliert.	67
Abb. 4.5b	PPAR's werden unabhängig von einer gesteigerten Metabolisierung durch freie Fettsäuren reguliert	67
Abb. 4.6.1a	Die basale uPAR-Expression unterliegt auf mRNA-Ebene einer Regulation durch die Proteinkinase C, nicht aber die Hochregulation durch Palmitat	70
Abb. 4.6.1b	Die basale uPAR-Expression unterliegt auf Proteinebene einer Regulation durch die Proteinkinase C, nicht aber die Hochregulation durch Palmitat	70
Abb. 4.7.	Palmitat vermittelt seine Effekte über den p38 MAPK Signalweg	71

Abb. 4.8.	Die akute Regulation des uPAR in vitro	72
Abb. 4.9.	Die akute Regulation des uPAR durch freie Fettsäuren in vivo	73
Abb. 4.10.	Die Effekte des nichtverstoffwechselbaren Fettsäureanalogon Bromopalmitat auf die uPAR-Expression	74
Abb. 4.11.	Komponenten der β -Oxidation unter dem Einfluss von freien Fettsäuren	75