

Aus dem Center for Cardiovascular Research
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Endothelzell-Differenzierungs-Gen-Rezeptoren bei
Fibroseprozessen in Herz (EDG-2) und Niere (EDG-1)**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Busch

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. med. H. Hampl
3. Prof. Dr. med. C. Grohé

Datum der Promotion: 01.06.2008

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **IV**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 PHOSPHOLIPIDE UND DEREN REZEPTOREN	1
1.1.1 LPA UND S1P	1
1.1.2 SYNTHESE DER SPHINGOLIPIDE LPA UND S1P	1
1.1.3 DIE EDG-REZEPTOREN	2
1.1.4 SIGNALWEGE VON LPA UND S1P	3
1.2 FIBROSEPROZESSE UND DEREN PARAMETER	3
1.2.1 MYOKARDIALE FIBROSE	3
1.2.2 LPA UND EXTRAZELLULÄRMATRIXPROTEINE	5
1.2.3 FIBROSEMODELLE IN VIVO UND IN VITRO	6
1.2.4 DER IMMUNMODULATOR FTY720	7
1.2.4.1 HERKUNFT UND REZEPTORBINDUNG VON FTY720	7
1.2.4.2 BEDEUTUNG VON FTY720 FÜR FIBROSEPROZESSE	8
1.3 FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSAUFBAU	9
1.3.1 ZIEL DER ARBEIT – EDG-REZEPTOREN UND FIBROSE	9
1.3.2 METHODISCHES VORGEHEN	9

2 MATERIAL UND METHODEN **12**

2.1 MATERIAL	12
2.1.1 GERÄTE	12
2.1.2 CHEMIKALIEN	12
2.1.3 PUFFER	14
2.1.4 ZELLKULTURMEDIEN	15
2.1.5 OLIGONUKLEOTIDE	16
2.1.6 ANTIKÖRPER, ENZYME & SONSTIGES	17
2.1.7 SOFTWARE	17
2.1.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN	18
2.2 METHODEN	18
2.2.1 ZELLKULTUR	18
2.2.2 TIERE UND -HALTUNG	19
2.2.3 FIBROBLASTEN-ISOLATION AUS RATTENMYOKARD	19
2.2.4 RNA-ISOLATION	20
2.2.5 DNASE-VERDAU	21
2.2.6 REVERSE TRANSKRIPTION	21
2.2.7 POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR)	22
2.2.7.1 SEMIQUANTITATIVE PCR	23
2.2.7.2 REAL TIME PCR	23
2.2.8 GELELEKTROPHORESE	28
2.2.9 XTT-PROLIFERATIONS-ASSAY	28
2.2.10 PROTEINBESTIMMUNG	29

2.2.10.1	PROTEINGEWINNUNG AUS ZELLKULTURSCHALEN	29
2.2.10.2	PROTEINMESSUNG	30
2.2.10.3	WESTERN BLOT	30
2.2.10.4	ELISA-DETEKTION VON PROTEINEN	33
2.2.11	PARAFFINEINBETTUNG VON MYOKARD- UND NIERENGeweBE	34
2.2.12	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	34
2.2.12.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNGEN (HE)	34
2.2.12.2	PAS-FÄRBUNG	35
2.2.12.3	SIRIUS RED FÄRBUNG	35
2.2.12.4	IMMUNFLUORESZENZ	36
2.2.13	APAAP-FÄRBESYSTEM	38
2.2.14	STATISTISCHE AUSWERTUNG	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	OPTIMIERUNG DER STIMULATIONSBEDINGUNGEN	40
3.1.1	PRIMEROPTIMIERUNGEN FÜR ZIEL- UND REFERENZGENE	40
3.1.2	AUSWAHL DER REFERENZGENE	41
3.1.3	OPTIMIERUNG DER LPA-KONZENTRATIONEN UND STIMULATIONSZEITEN	43
3.1.4	NACHWEIS DES EDG-2 REZEPTORS AUF M-RNA-EBENE	44
3.1.5	NACHWEIS DES EDG-2 REZEPTORS AUF PROTEINEBENE	44
3.2	GENEXPRESSION UNTER LPA-STIMULATION	45
3.2.1	PRIMEROPTIMIERUNGEN FÜR DIE „REAL-TIME PCR“	45
3.2.2	AMPLIFIKATIONSKURVEN	45
3.2.3	DISSOZIATIONSKURVEN	46
3.2.4	CHARAKTERISIERUNG DER PCR-PRODUKTE MITTELS GELELEKTROPHORESE	47
3.2.5	KONSTANTE EXPRESSION VON CTGF, TGF- β , COL I, COL III, FIBRONECTIN, MMP-2 M-RNA UND VERMINDERTE EXPRESSION VON MMP-9 UND TIMP-2 M-RNA NACH LPA-STIMULATION	49
3.2.6	TGF- β VERÄNDERT DIE EXPRESSION VON FIBROSEZIELGENEN	51
3.3	FEHLENDE REGULATION VON FIBROSE-RELEVANTEN GENEN NACH LPA-STIMULATION AUF PROTEINEBENE	53
3.3.1	TGF- β UND FN-PROTEINEXPRESSION ÄNDERT SICH NICHT NACH LPA-STIMULATION	53
3.4	PRO-PROLIFERATIVE EFFEKTE VON LPA, S1P UND TGF-β AUF RATTENFIBROBLASTEN	53
3.4.1	OPTIMIERUNGEN: ZELLZAHL PRO WELL, ZEIT NACH ASSAY-BEGINN, STIMULUSZEIT UND STIMULANSKONZENTRATION	54
3.4.2	LPA INDUZIERT DIE PROLIFERATION VON RATTENFIBROBLASTEN	54
3.4.3	PRO-PROLIFERATIVE EFFEKTE VON S1P AUF RATTENFIBROBLASTEN	56
3.4.4	TGF- β STIMULIERT DIE PROLIFERATION VON RATTENFIBROBLASTEN	56
3.4.5	KOSTIMULATIONEN	57
3.5	ZELLULÄRE UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION	58
3.5.1	DARSTELLUNG DER RATTENFIBROBLASTEN WÄHREND LPA STIMULATION	58
3.5.2	RATTENMYOKARD HE-FÄRBUNG	60
3.5.3	RATTENMYOKARD PAS-FÄRBUNG	60
3.5.4	CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN ZELLEN - IMMUNFLUORESZENZ	61
3.5.5	DARSTELLUNG VON EDG-1 UND EDG-2 AUF FIBROBLASTEN- IMMUNFLUORESZENZ	62
3.5.6	PCNA UND EDG-2 ÜBER P1-P5 AUF RATTENFIBROBLASTEN - IMMUNFLUORESZENZ	64
3.6	BEDEUTUNG VON EDG-1 BEI DER CHRONISCH PROGREDIENTEN GLOMERULOSKLEROSE	65
3.6.1	EDG-1 IN RATTEN-NIERENPARAFFINSCHNITTEN - IMMUNFLUORESZENZ	65
3.6.2	TUBULÄR BETONTE LOKALISATION VON EDG-1 BEI ANTI-THY-1-INDUZIERTER CHRONISCH PROGREDIENTER GLOMERULOSKLEROSE	66
3.6.3	VERMINDERTE EDG-1 PROTEINEXPRESSION BEI PROTEINURIE IN ANTI-THY-1-INDUZIERTER CHRONISCH PROGREDIENTER GLOMERULOSKLEROSE	68
3.6.4	DIE ANTI-THY-1-INDUZIERTE CHRONISCHE GSC BLEIBT OHNE AUSWIRKUNG AUF DIE EZM-ZUSAMMENSETZUNG DES RATTENMYOKARDS - SIRIUS-RED-FÄRBUNG	68

4	<u>DISKUSSION</u>	70
4.1	LYSOPHOSPHATIDYLSÄURE UND KARDIALE FIBROSEPROZESSE	70
4.2	EDG-1 IN DER ANTI-THY-1 INDUZIERTEN GLOMERULOSKLEROSE	76
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	77
5.1	LPA INDUZIERT PROLIFERATION VON KARDIALEN RATTENFIBROBLASTEN NICHT ABER DIE KOLLAGEN-SYNTHESE	77
5.2	EDG-1 EXPRESSION IM VERLAUF DER ANTI-THY-1-INDUZIERTEN CHRONISCH PROGREDIENTEN GLOMERULOSKLEROSE	77
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	79
	<u>DANKSAGUNG</u>	86
	<u>ERKLÄRUNG</u>	87
	<u>LEBENS LAUF</u>	88
	<u>PUBLIKATIONEN</u>	89

Abkürzungsverzeichnis

aGSC.....	akute GSC	kD.....	kilo Dalton
Ak.....	Antikörper	LPA.....	Lysophosphatidylsäure
AP.....	alkalische Phosphatase	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
APAAP.....	Alkaline Phosphatase	MMP.....	Matrix Metalloproteinase
.....	anti alkaline Phosphatase	MnCl ₂	Manganchlorid
APS.....	Ammoniumpersulfat	mRNA.....	<i>messenger</i> -RNA
AS.....	Aortenstenose	P1-5.....	Passagenanzahl eins bis fünf
ATCC.....	PAS.....	Periodic-Acid-Schiff
....."American Type Culture Collection"	PBS.....	Phosphat Buffer Saline
BCA.....	Bicichinon-Säure	PBS-T...Phosphate buffered Saline Tween	
BSA.....	Bovine Serum Albumin Lösung	PCNA...Proliferating Cell Nuclear Antigen	
bp.....	Basenpaare	PCR.....	Polymerase Chain Reaction
CCR...Centre for Cardiovascular Research		PIC.....	Proteinsaseinhibitorcocktail
cDNA.....	complementary DNA	PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
cGSC.....	chronische GSC	Pox.....	Peroxidase
Col I.....	Kollagen Typ 1	PSG.....	Penicillin Streptomycin Glutamin
Col III.....	Kollagen Typ 3	RAS.....	Renin-Angiotensin-System
CTGF.....	Connective tissue growth factor	RNA.....	Ribonukleinsäure
Ct-Wert....."threshold cycle"	RNAse.....	Ribonuklease
Cy3.....	Indocarbocyanin	rpm.....	rounds per minute
DAPI.....	4',6-Diamidino-2-phenylindol	Rafibs.....	Rattenfibroblasten
DCM.....	Dilatative Kardiomyopathie	ROX.....	5-carboxy-.....X-rhodamin-triethyl-ammoniumsals
DEPC.....	Diethylpyrocarbonat	RT.....	Raumtemperatur
DMSO.....	Dimethylsulfoxid	RT-PCR.....	Reverse Transkription PCR
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure	rT-PCR.....	real time PCR
DNase.....	Desoxyribonuklease	SDS.....	Sodiumduodecylsulfat
DTT.....	Dithiothreitol	siRNA.....	small interfering RNA
EDG...Endotheliales Differenzierungsgen		SPK.....	Sphingosinkinase
EDG-1.....	EDG Rezeptor Typ1	S1P.....	Sphingosin-1-phosphat
EDG-2.....	EDG Rezeptor Typ2	SV.....	Stimulationsversuch
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat	TBE.....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
ELISA.....	TGF-β.....	Transforming Growth Factor β
.....	enzyme linked immunosorbent assay	THY-1.....	Thy-1-like Antigen
EZR.....	Extrazellulärraum	TIMP.....	Inhibitor der MMP
EZM.....	Extrazellulärmatrix	TWEEN20.....Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
FITC.....	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat	TBS-T.....	Tris buffered Saline - Tween
FKS.....	fetales Kälberserum	UV.....	Ultraviolett
FN.....	Fibronectin	Vim.....	Vimentin
FTY720.....	2-Amino-2-.....(2-(4-octylphenyl)ethyl)-1,3-propanediol	VSMC's.....	vaskuläre glatte Muskelzellen
GAPDH.....Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase	vWF.....	von Willebrandt Faktor
.....	Glomerulosklerose	XTT.....	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
GSC.....	Glomerulosklerose	WB.....	Western Blot
HE.....	Hämatoxylin-Eosin		
HUVEC's.....	humane		
.....	Nabelschnurvenen-Endothelzellen		
kb.....	Kilobasen		

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Vera Regitz-Zagrosek für die sehr gute Betreuung und die Möglichkeit, diese Thematik in ihrem Labor bearbeiten zu können. Ebenso möchte ich ihr für die wissenschaftliche Ausbildung im Rahmen des Graduiertenkollegs, für die vielen anregenden Diskussionen und die Möglichkeit von Kongressbesuchen danken.

Des Weiteren bin ich Frau Dr. Eva Becher zu tiefem Dank verpflichtet, die mir bei der täglichen Arbeit inhaltlich wie praktisch als Betreuerin zur Seite stand. Den anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die vielen hilfreichen Anregungen, insbesondere Frau Jenny Thomas, Anja Angelov und Britta Hannack für die technische Unterstützung, sowie Frau Elke Dworazek, Dr. Shokufeh Mahmoodzadeh und Dr. Carola Schubert, die mir an vielen Stellen mit praktischen Ratschlägen geholfen haben.

Aus der AG Thomas Unger möchte ich mich bei Frau Christiane Sprang und Dr. Christa Thöne-Reinecke für die Unterstützung bei der Herzentnahme bedanken, sowie bei Markus Clemenz für gute Zusammenarbeit beim XTT-Assay. Außerdem bei den Arbeitsgruppen von Prof. Unger und Prof. Ruiz für die Mitbenutzung der SYBR-Green Technik und bei der Arbeitsgruppe von Prof. Theuring für die humane Endothelzelllinie.

Ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus Dr. Stephanie Krämer und den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harm Peters für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der EDG-1 Rezeptorexpression in renalem Gewebe.

Außerdem möchte ich mich bei meinem persönlichen Umfeld bedanken, das mit viel Verständnis und Nachsicht auf meinen Wunsch nach einer Dissertation neben dem Medizinstudium reagiert hat.

Diese Dissertation entstand auch im Rahmen einer Kooperation der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Regitz-Zagrosek mit Sanofi-Aventis Deutschland GmbH.

„Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.“

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit investiert hat, wieder wegzuerwerfen.“

Albert Einstein (4.03.1879 - 18.04.1955)
deutscher Physiker und Nobelpreisträger

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Jonas Busch, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Unterschrift

Berlin, den 10.12.2006

Lebenslauf

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