

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Stimulationsbedingungen

3.1.1 Primeroptimierungen für Ziel- und Referenzgene

Bevor eine m-RNA-Quantifizierung mittels PCR durchgeführt werden konnte, mussten die PCR-Bedingungen optimiert werden, allen voran musste mittels eines Temperaturgradienten im Heizblock die optimale Annealing-Temperatur ermittelt werden.

Danach war eine Ermittlung der optimalen Zyklusanzahl essentiell. Die Amplifizierung der PCR-Produkte folgte einer exponentiellen Funktion mit einem angenähert linearem Anstieg und einem Plateau (siehe Abb.2.2.7.2a). Zur Quantifizierung musste daher die Zykluszahl so gewählt werden, dass die Vervielfältigung des PCR-Produktes noch im exponentiellen Bereich lag. Hierfür wurde eine PCR mit einer festgelegten Endzykluszahl von z.B. 40 Zyklen durchgeführt. Während der Amplifikation wurde beginnend von einer mittleren Zykluszahl jeweils alle zwei Zyklen eine Probe aus dem Gerät genommen. Anschließend erfolgte eine Auswertung der Amplifikate mittels Gelelektrophorese (siehe Abb. 3.1.1a-c & Tabelle 3.1.1).

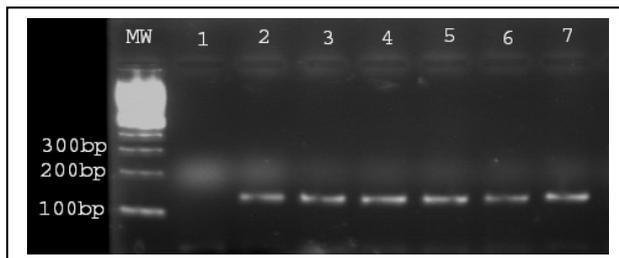


Abb. 3.1.1a: Temperaturprofil rCol 1 mit 125bp MW. Negativ Kontrolle mit Aqua dest. in Spur 1. In den weiteren Spuren Variationen der Annealing Temp. Spur 2 - 54°C, Spur 3 - 55,9°C, Spur 4 - 58,9°C, Spur 5 - 60,5°C, Spur 6 - 62,2°C und in Spur 7 - 65°C Annealing-Temperatur. 2%iges Agarose Gel mit 2,56 sec. Belichtung.

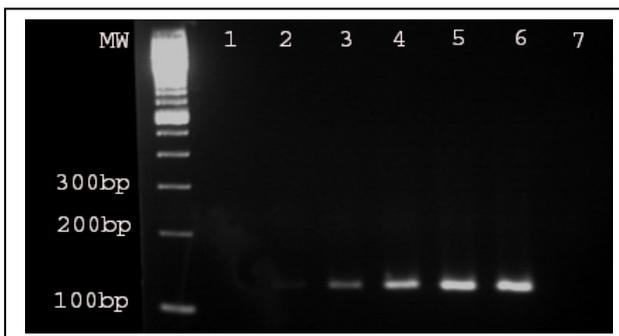


Abb. 3.1.1b: Zyklusprofil rCol 1 mit 125 bp MW. Negativ Kontrolle mit Aqua dest. in Spur 7. In den anderen Spuren Variationen der Gesamtzykluszahl. Spur 1 - 18 Zyklen, Spur 2 - 21 Zyklen, Spur 3 - 24 Zyklen, Spur 4 - 27 Zyklen, Spur 5 - 30 Zyklen und in Spur 6 - 33 Zyklen. 2%iges Agarose Gel mit einer Belichtung von 0,72 sec.

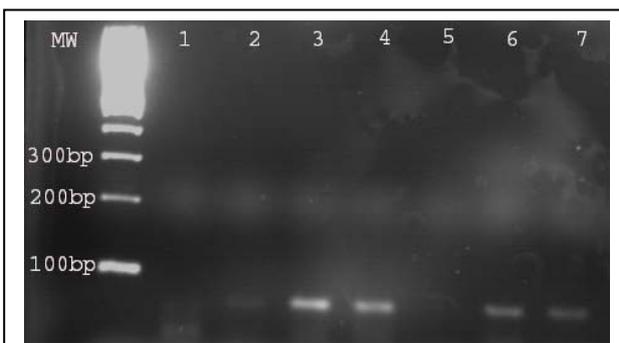


Abb. 3.1.1c: Zyklusprofil rTGF-beta mit 69bp MW. Negativ Kontrolle mit Aqua dest. in Spur 1. In den übrigen Spuren Variationen der Annealing-Temp. Spur 2 - 54°C, Spur 3 - 55,9°C, Spur 4 - 58,9°C, Spur 5 - 60,5°C, Spur 6 - 62,2°C und in Spur 7 - 65°C Annealing-Temperatur. 2%iges Agarose Gel mit 1,28 sec. Belichtung.

Tabelle 3.1.1: Übersicht zur Primeroptimierung von Ziel- und Referenzgenen für die semiquantitative PCR. Dargestellt sind die Ergebnisse aus Optimierungen der Annealing-Temperatur und Zykluszahl (so.). Die PCR-Amplifikationen wurden mit 50 ng Template vorgenommen, nur bei Amplifikationen mit den 18-S RNA Primern wurden 20 ng verwendet. Die Primer für MMP-2, TIMP-2 und MMP-9 wurden nur für das *real time* PCR Verfahren eingesetzt.

<i>Gen</i>	<i>Länge in bp</i>	<i>Annealing-Temp.</i>	<i>Anstieg bei ...Zyklen</i>
rCTGF	140 bp	55°C	23 Zyklen
rTGF-β	69 bp	55,9°C	30 Zyklen
rCol I	125 bp	60,5°C	24 Zyklen
rCol III	78 bp	60°C	27 Zyklen
rFN	81 bp	55°C	26 Zyklen
rEDG-1	131 bp	56°C	33 Zyklen
rEDG-2	218 bp	58,5°C	30/31 Zyklen
rGAPDH	209 bp	60°C	25 Zyklen
rβ-Actin	101 bp	60°C	24 Zyklen
18-S	107bp	60°C	11 Zyklen 20ng

3.1.2 Auswahl der Referenzgene

Die Auswahl eines geeigneten Referenzgens ist für die Auswertung von m-RNA-Amplifikaten von zentraler Bedeutung. Dieses Referenzgen darf nicht reguliert sein, damit es als konstanter Bezugspunkt für die Zielgene verwendet werden kann.

Im Vorfeld der Arbeit konkurrierten GAPDH als „housekeeping“ Gen, β-Actin und 18-S RNA um den Status des zu verwendenden Referenzgens. Bei den ersten beiden zeigten sich in den Proben mit der höchsten Stimulanskonzentration eine verstärkte Signalintensität, so dass 18-S RNA besser geeignet schien (siehe Abb. 3.1.2a-d).

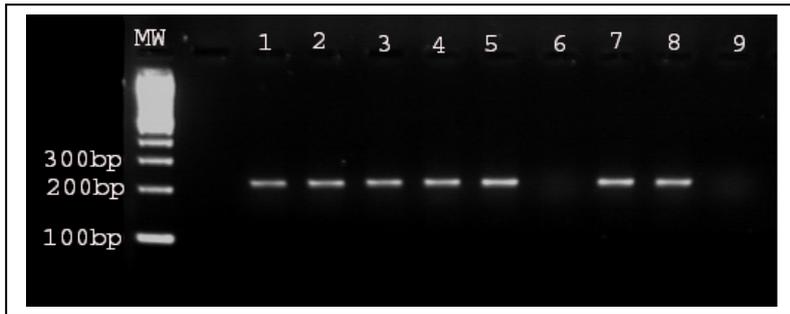


Abb. 3.1.2a: rGAPDH bei 234bp. Proben aus 2.SV. 2%iges Agarose Gel. Pipettierfehler in Spur 6. Belichtung für 0,36 sec.

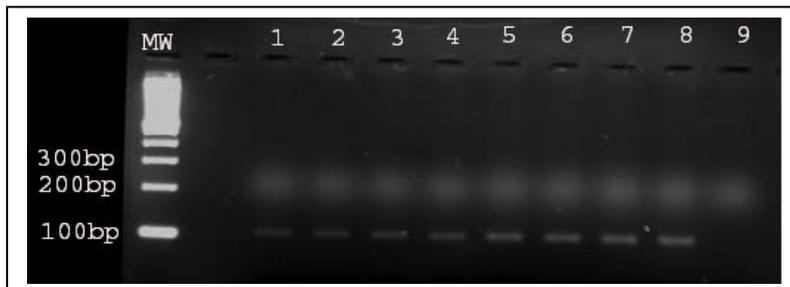


Abb. 3.1.2b: rβ-Actin bei ...bp. Proben aus 2.SV. 2%iges Agarose Gel. Belichtung für 0,48 sec.

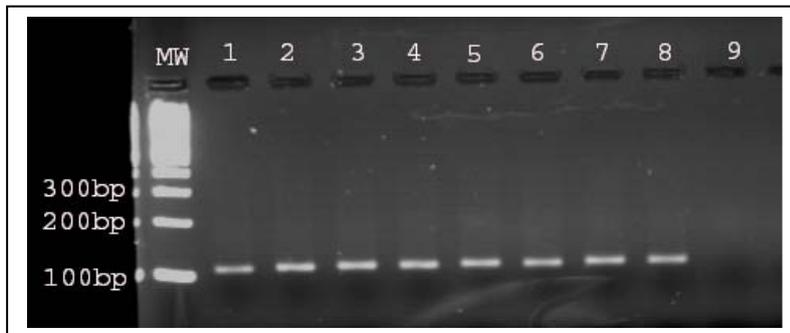


Abb. 3.1.2c: r18-S RNA bei 107bp. Proben aus 2.SV. 2%iges Agarose Gel. Belichtung für 0,48 sec.

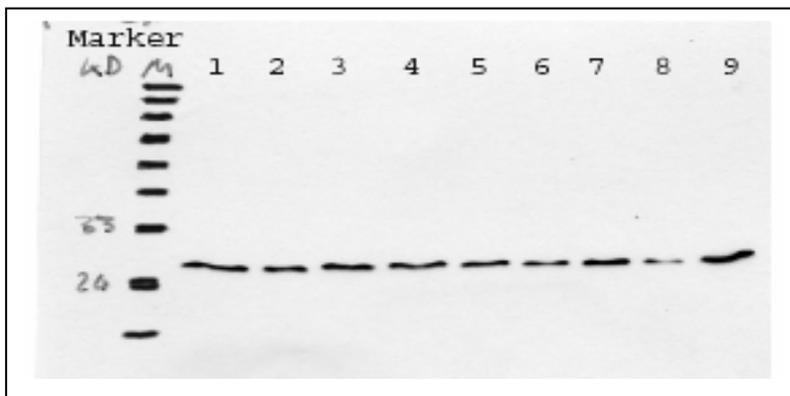


Abb. 3.1.2.d: Western Blot rGAPDH mit 36 kD Proteingröße. 10%iges Gel mit je 12 µg Protein in Spuren 1-8 und 24 µg in Spur 9. Proben aus dem 2.SV. Entwicklungszeit betrug 10 min.

Abb. 3.1.2a-d: Referenzgenauswahl. **Abb. 3.1.2a-c** Proben stammen aus dem 2.SV. In Spur 1+2 sind jeweils unstimulierte Proben der Kontrollgruppe, in Spur 3+4 mit 0,1 µM LPA stimulierte Rafibs, in Spur 5+6 mit 1 µM LPA stimulierte Proben und in 7+8 mit 5 µM LPA stimulierte Rafibs. In Spur 9 ist die Negativ-Kontrolle der PCR-Amplifikation mit Aqua dest. aufgetragen. Die Stimulationszeit für die RNA-Proben betrug 6 Stunden.

Abb. 3.1.2d Proteine stammen aus dem 2.SV. In Spur 1+2 sind jeweils unstimulierte Proben der Kontrollgruppe, in Spur 3+4 mit 0,1 µM LPA stimulierte Rafibs, in Spur 5+6 mit 1 µM LPA stimulierte Proben und in 7+8 mit 5 µM LPA stimulierte Rafibs. In Spur 9 sind Proteine von nicht-stimulierten Rattenfibroblasten aus Passage 3 aufgetragen. Die Stimulationszeit für die Protein-Proben betrug 24 Stunden.

3.1.3 Optimierung der LPA-Konzentrationen und Stimulationszeiten

Bevor mit der eigentlichen Versuchsreihe begonnen werden konnte, mussten die geeigneten Stimulationsbedingungen ermittelt werden. Hierzu wurden mehrere Stimulationen (Stimulationsversuche 1.SV-3.SV) mit unterschiedlichen Konzentrationen des Stimulans LPA bei verschiedenen Stimulationszeiten ausprobiert und mit dem semiquantitativen PCR-Verfahren ausgewertet (siehe Tabelle 3.1.3).

Tabelle 3.1.3: Übersicht zu Optimierungen mit semiquantitativem Auswertverfahren: Dargestellt sind die verschiedenen Zeitpunkte, an denen die Genexpression der Zielgene im Rahmen der Optimierungen gemessen wurde. Neben den Zeitpunkten sind die Stimulationsbedingungen, der entsprechende Versuch und der Hinweis auf evt. regulierte Gene genannt. Jede Gruppe an stimulierten Zellen besaß eine eigene zeitpunktentsprechende, unstimulierte Kontrollgruppe. Die Anzahl der Zellkulturschalen pro Gruppe betrug im 1. & 2.SV zwei Schalen, im 3.SV drei bis vier Schalen. Die Proteinproben für den Western Blot stammten aus dem 1.SV bei 24h mit den drei genannten Stimulanskonzentrationen; die Zellkulturüberstände für die ELISA-Bestimmung aus dem 3.SV bei 48h mit 1,0 μM und 10 μM LPA.

<i>Stimulations-Versuch</i>	<i>Zeitpunkt</i>	<i>LPA Konzentration</i>	<i>Evtl. regulierte Gene</i>
1.SV	12h	0,01 μM LPA	keine
		0,1 μM LPA	keine
		1,0 μM LPA	keine
2.SV	6h	0,1 μM LPA	keine
		1,0 μM LPA	keine
		5 μM LPA	keine
3.SV	4h	0,1 μM LPA	keine
		1,0 μM LPA	Col I, CTGF
	12h	1,0 μM LPA	Col I, CTGF
		10 μM LPA	keine
	48h	1,0 LPA	TGF- β , Fibronectin
10 μM LPA		TGF- β , CTGF, Fibronectin	

Die Auswertung der ersten beiden Stimulationsversuche gestaltete sich aufgrund technischer Probleme und der sehr kleinen Gruppengröße als schwierig. Diese ersten Versuche waren wichtig für die Entwicklung des Stimulationsmodells. Die Auswertung des 3.SV wurde später noch mit der „real time PCR“ verifiziert.

Letztendlich wurden als geeigneter Versuchsaufbau ein kurzer Zeitpunkt bei 90 min und ein längerer bei 24 Stunden mit einer LPA-Konzentration von 1,0 μM ausgewählt. Aufgrund der

Überlegenheit der mittlerweile gut etablierten „real time PCR“ Methode im Vergleich zu semiquantitativen Verfahren wurde für die sich anschließende Hauptversuchsreihe die rT-PCR favorisiert.

In den Optimierungsprozessen konnten keine Unterschiede zwischen Fibroblasten aus männlichen oder weiblichen Ratten entdeckt werden, so dass für die Hauptversuchsreihe männliche Rattenfibroblasten benutzt wurden. Aus zeitlichen Gründen konnten über die Optimierungen hinaus an den Rattenfibroblasten keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden.

3.1.4 Nachweis des EDG-2 Rezeptors auf m-RNA-Ebene

Rezeptor für LPA ist u.a. der EDG-2 Rezeptor. Die Rattenfibroblasten exprimieren diesen Rezeptor auf m-RNA-Ebene, wie in der PCR mit cDNA und entsprechenden Primern gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.1.4).

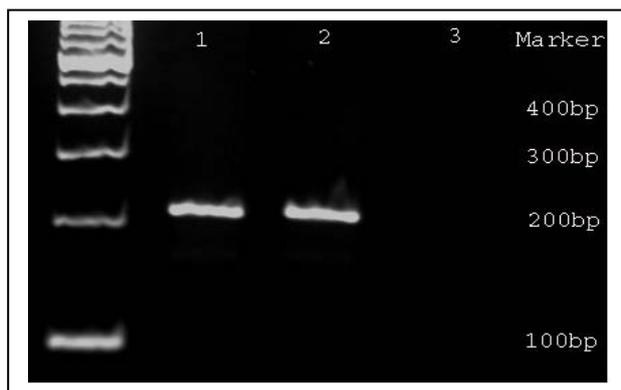


Abb. 3.1.4. Nachweis der EDG-2 Rezeptoren in Rattenfibroblasten:

In Spur 1 und 2 sind die Amplifikate von mRNA aus dem 8.SV mit EDG-2 Primern aufgetragen. Banden bei 218bp; Spur 3 als Negativ-Kontrolle mit Aqua dest. ohne Bande; 2%iges Agarose Gel; Belichtung 0,72 sec.;

3.1.5 Nachweis des EDG-2 Rezeptors auf Proteinebene

Ebenso sind die EDG-2 Rezeptoren auf Proteinebenen vorhanden, wie in Proben aus mit LPA stimulierten Rattenfibroblasten gezeigt werden konnte (siehe Abb.3.1.5.) Eine Aussage zu einem möglichen Effekt von LPA auf die EDG-2 Rezeptorexpression war dabei nicht möglich.

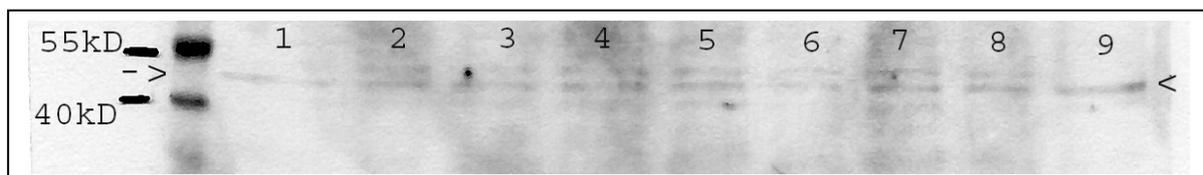


Abb. 3.1.5: EDG-2 Western Blot mit ca. 50kD Proteingröße (siehe Pfeil).10%iges Gel mit je 12 μ g Protein aus dem 2.SV in Spuren 1-8 und 24 μ g in Spur 9. Entwicklungszeit betrug 30min. In Spur 1+2 sind jeweils unstimulierte Proben der Kontrollgruppe, in Spur 3+4 mit 0,1 μ Mol LPA stimulierte Rafibs, in Spur 5+6 mit 1 μ Mol LPA stimulierte Proben und in 7+8 mit 5 μ Mol LPA stimulierte Rafibs. In Spur 9 sind Proteine von nicht-stimulierten Rattenfibroblasten aus Passage 3 aufgetragen. Die Stimulationszeit mit LPA im 2.SV für die Protein-Proben betrug 24 Stunden.

3.2 Genexpression unter LPA-Stimulation

3.2.1 Primeroptimierungen für die „real-time PCR“

Vor der Verwendung der genspezifischen Primer wurden mit jedem Primerpaar Amplifikationen einer Standardkurve aus einem Pool von unterschiedlichen mit LPA stimulierten cDNA-Proben vorgenommen. Dabei wurden auch unterschiedliche Verhältnisse des Vorwärts- und Rückwärtsprimers ausprobiert, 1:1 F/R, 1:3 F/R oder 3:1 F/R sowie die Primerendkonzentration variiert (siehe Tabelle 2.2.7.2d in Material und Methoden).

3.2.2 Amplifikationskurven

Die Auswertung der verschiedenen Genexpressionsniveaus mit Hilfe der „real time PCR“ erfolgte durch ein standardisiertes Computerauswertungsprogramm der ABI-7000 Prism Software (siehe 2.1.7 in Material und Methoden). Von entscheidender Bedeutung waren hierbei einwandfreie Amplifikationskurven, aus denen über die Ct-Werte die verschiedenen m-RNA Mengen ermittelt werden konnten (siehe Abb. 3.2.2a & b). Nur einwandfreie Amplifikationskurven erlauben eine Berechnung der RNA-Mengen im Bereich des linearen Anstiegs (siehe 2.2.7.2 Material und Methoden).

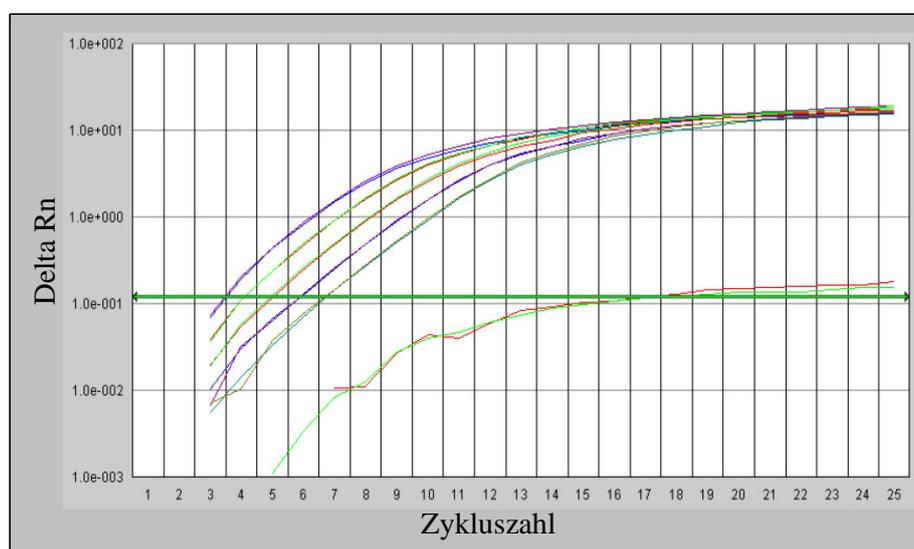


Abb. 3.2.2a: Amplifikationskurve Taqman 18-S. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Standardwerte für Rafibs aus dem 6.SV mit dem 18-S Primerpaar sowie Wasserkontrollen als Doppelwerte. Der grüne horizontale Balken stellt den Schwellenwert dar, bei dem die „Auto-CT-Funktion“ der Abi 7000-Software die Werte der einzelnen Proben berechnet hat.

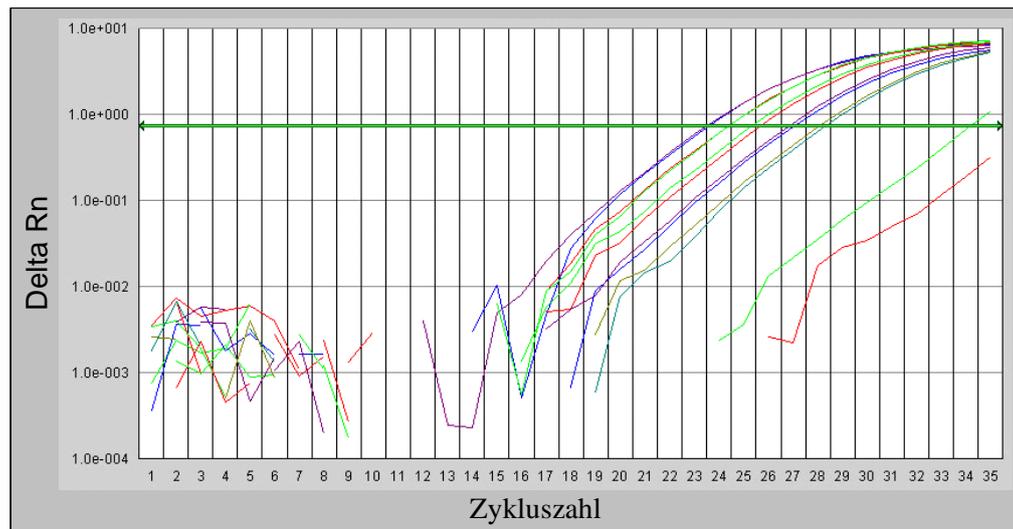


Abb. 3.2.2b: Amplifikationskurve Taqman Col I. Dargestellt sind die Amplifikationskurven der Standardwerte für Rafibs aus dem 6.SV mit dem Col I Primerpaar sowie Wasserkontrollen als Doppelwerte. Der grüne horizontale Balken stellt den Schwellenwert dar, bei dem die „Auto-CT-Funktion“ der Abi 7000-Software die Werte der einzelnen Proben berechnet hat.

3.2.3 Dissoziationskurven

Die Dissoziationskurven im Anschluss an eine rT-PCR dienen der Spezifitätskontrolle der Primer, wie auch der internen Kontrolle insgesamt (siehe Abb. 3.2.3a & b). Bedingt durch den SYBR-Mix konnte ein so genanntes „Rampenphänomen“ beobachtet werden. Darunter ist ein kontinuierlicher Abfall des Signalniveaus der PCR-Produkte bis zum genspezifischen steilen Anstieg bei der Schmelztemperatur des Primers zu verstehen. Dieses Phänomen stellte sich in Vergleichen mit rT-PCR-Läufen mit anderen Farbstoffgemischen als nicht relevant und mixspezifisch heraus.

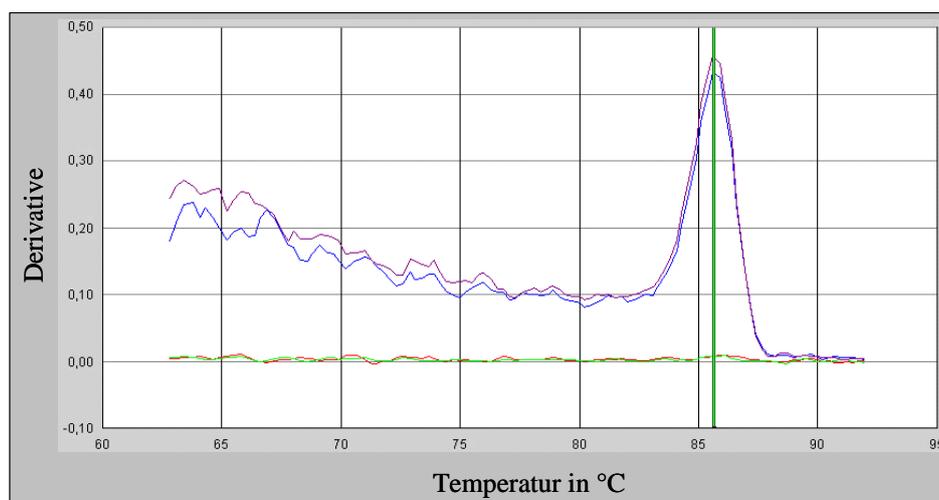


Abb. 3.2.3a: Schmelzkurve zu 6.SV 18-S Rafibs. Dargestellt ist die Schmelzkurve für zwei Werte aus der Standardreihe in blau und lila plus die Wasserkontrollen in rot und grün. Der grüne vertikale Balken markiert die genspezifische Schmelztemperatur bei 85,6°C.

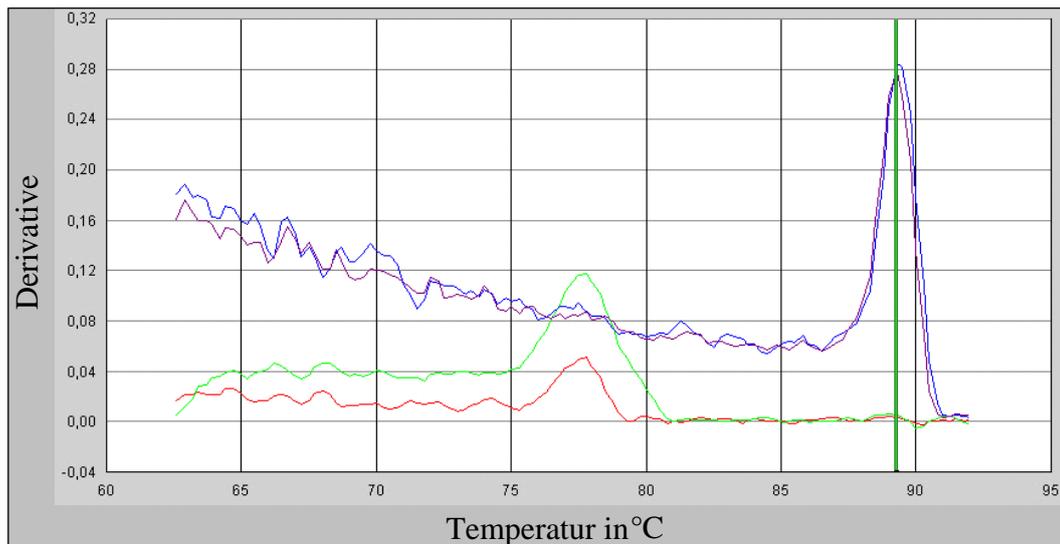


Abb. 3.2.3b: Schmelzkurve zu 6.SV Col I Rafibs. Dargestellt ist die Schmelzkurve für zwei Werte aus der Standardreihe in blau und lila plus die Wasserkontrollen in rot und grün. Der grüne vertikale Balken markiert die genspezifische Schmelztemperatur bei 89,2°C.

3.2.4 Charakterisierung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese

Als zusätzliche Kontrolle der PCR-Amplifikation wurden exemplarisch Proben aus den Standardkurven einer jeden rT-PCR auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das Bandenmuster auf Amplifikatgröße und mögliche Dimerbildungen überprüft. Die Größen entsprachen den vom Hersteller gemachten Angaben, die Bildung von Dimeren wurde nicht beobachtet (siehe Tabelle 3.2.4 und Abb. 3.2.4a-e.).

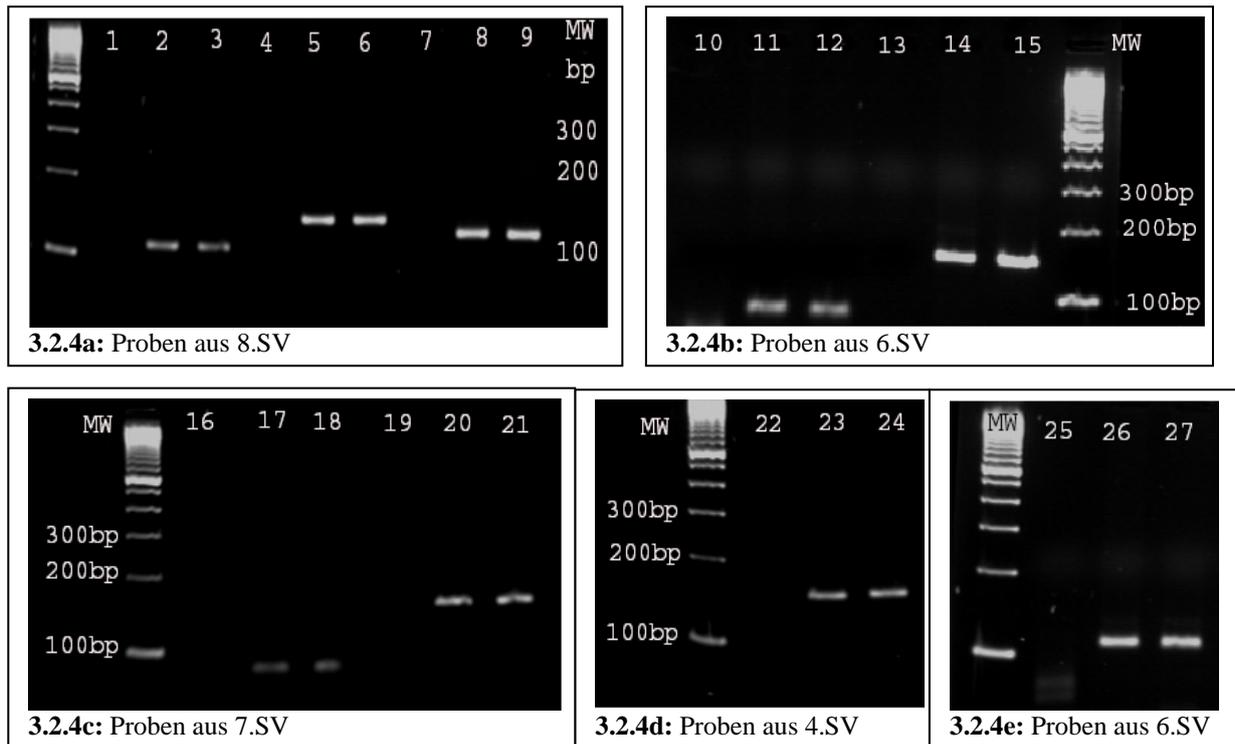


Abb. 3.2.4a - e: Kontrollgele 1-5 für rT-PCR Amplifikate: Für jedes Gen wurden drei Proben aus verschiedenen Experimenten auf 2%ige Agarose Gele aufgetragen. Erste Spur immer die Negativ-Kontrolle mit Aqua dest. **3.2.4a:** Proben für 18-S RNA, CTGF, Col I. **3.2.4b:** Proben für TGF- β und Col III. **3.2.4c:** Proben für Fibronectin und MMP-2. **3.2.4d:** Proben für TIMP-2. **3.2.4e:** Proben für MMP-9. Siehe auch Tabelle 3.2.4 unten.

Tabelle 3.2.4: Primer mit Spurangabe. Die Größe der Amplifikate aus Abb. 3.2.4a - e wurden anhand der vom Hersteller angegebenen Längen überprüft.

<i>Primer</i>	<i>Größe MW</i>	<i>Spur...</i>	<i>Primer</i>	<i>Größe MW</i>	<i>Spur...</i>
18-S RNA	107 bp	1-3	TGF- β	69 bp	10-12
CTGF	140 bp	4-6	MMP-2	153 bp	19-21
Col I	125 bp	7-9	TIMP-2	141 bp	22-24
Col III	140 bp	13-15	MMP-9	102 bp	25-27
Fibronectin	81 bp	16-18			

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

Nach den Optimierungen mit der semiquantitativen PCR-Methode wurden für das Experiment zwei Zeitpunkte und eine Konzentration als Stimulationsbedingung gewählt und mit der rT-PCR ausgewertet. Die Rattenfibroblasten wurden mit 1,0 μ M LPA für 90min und 24 Stunden stimuliert. Jede Gruppe bestand aus drei bis vier Zellkulturschalen und wurde mit einer eigenen unstimulierten Kontrollgruppe verglichen. Als interne Kontrolle dienten Nullwerte entsprechender unstimulierter Zellkulturschalen (siehe Abb.3.2.5a).

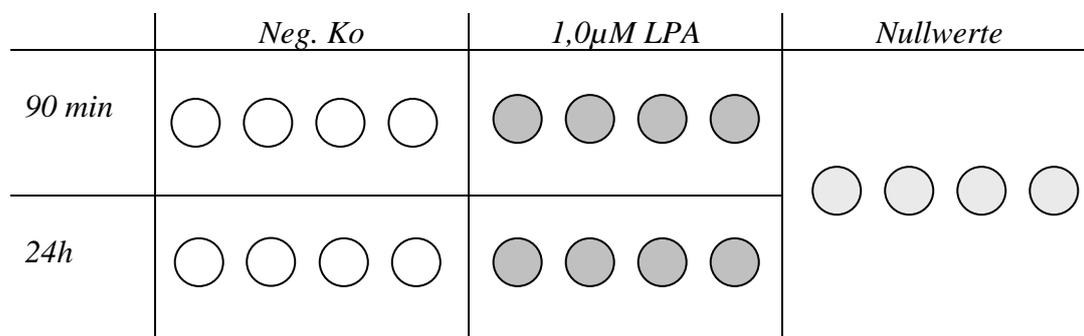


Abb. 3.2.5a: Schema für LPA Stimulation der Rafibs; Kreise symbolisieren jeweils eine Zellkulturschale.

Die Auswertung möglicher Regulationen der Fibrosemarkergene CTGF, Col I, Col III, Fibronectin, TGF- β , MMP-2, TIMP-2 und MMP-9 auf m-RNA Ebene erfolgte mit der real-time PCR-Methode. Insgesamt wurde der Versuch mindestens drei Mal wiederholt (Stimulationsversuch 4, 5, 6 & 8) und die Einzelwerte aller Versuche zusammen ausgewertet. Alle Messungen erfolgten als Doppelwerte bezogen auf das Referenzgen 18-S RNA. Es konnten keine signifikanten Regulationen der Gene CTGF, Col I, Col III, Fibronectin TGF- β und MMP-2 festgestellt werden (siehe Abb3.2.5b-g.).

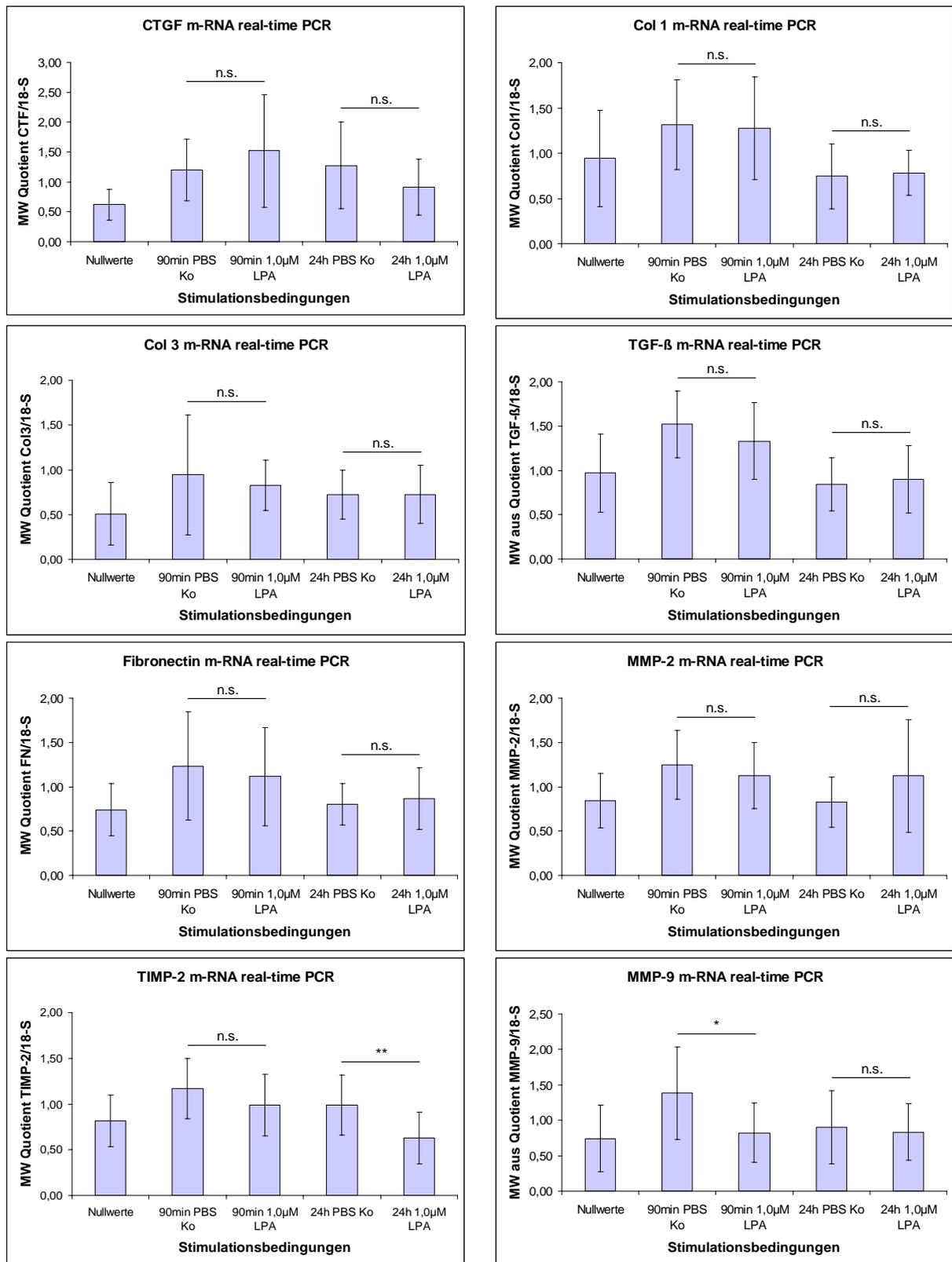


Abb. 3.2.5b-i: Gesamtübersicht mehrerer Stimulationsversuche. Genexpression unter LPA Stimulation für jedes Fibrose-Zielgen: CTGF, Col I, Col III, TGF-β, Fibronectin, MMP-2, MMP-9 und TIMP-2. Amplifikation mit der real time PCR. Rafibs wurden nach 24h Serumentzug für 90 min bzw. 24h mit PBS (PBS Ko) oder 1μM LPA stimuliert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Quotienten aus dem entsprechenden Zielgen und 18-S RNA plus ihre Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test als Vergleich zwischen mit LPA behandelten Zellen zu mit PBS behandelten: n.s. – nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Die Gruppengröße variierte zwischen $n=10$ bis $n=14$. Zusätzlich sind die Nullwerte dargestellt.

Für MMP-9 und TIMP-2 ergaben sich folgende statistisch signifikante Regulationen: Die MMP-9 Expression in Rattenfibroblasten wurde auf m-RNA Ebene durch 90 min Stimulation mit 1,0 μ M LPA im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe auf ca. 60% reduziert. Nach 24h LPA Stimulation ist dieser Effekt nicht zu erkennen. Die Expression von TIMP-2 wurde hingegen erst nach 24h LPA Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen signifikant auf ca. 63% vermindert (siehe Abb. 3.2.5h & i).

3.2.6 TGF- β verändert die Expression von Fibrosezielgenen

Um zu zeigen, dass sich die Genexpression der ausgewählten Fibrosemarkergene in Rattenfibroblasten beeinflussen lässt, wurde das bekannte pro-fibrotische Cytokin TGF- β_1 eingesetzt (7.SV). Dabei wurde die Fibroblastenzellkultur mit 15 ng/ml TGF- β für 90 min und 24 Stunden stimuliert. Die Gruppenverteilung und Auswertung fand nach dem bekannten Schema statt (siehe Abb. 3.2.5a). Bei insgesamt drei bis vier Werten pro Gruppe konnten nur Aussagen im Sinne von Tendenzen getroffen werden, da die statistische „Power“ nicht ausreichend war.

Die TGF- β_1 Stimulation der Rattenfibroblasten zeigte folgende Tendenzen: Col I und TGF- β mRNA Mengen wurden gesteigert, die Genexpression von MMP-2 und TIMP-2 hingegen vermindert (siehe Abb.3.2.5a-d).

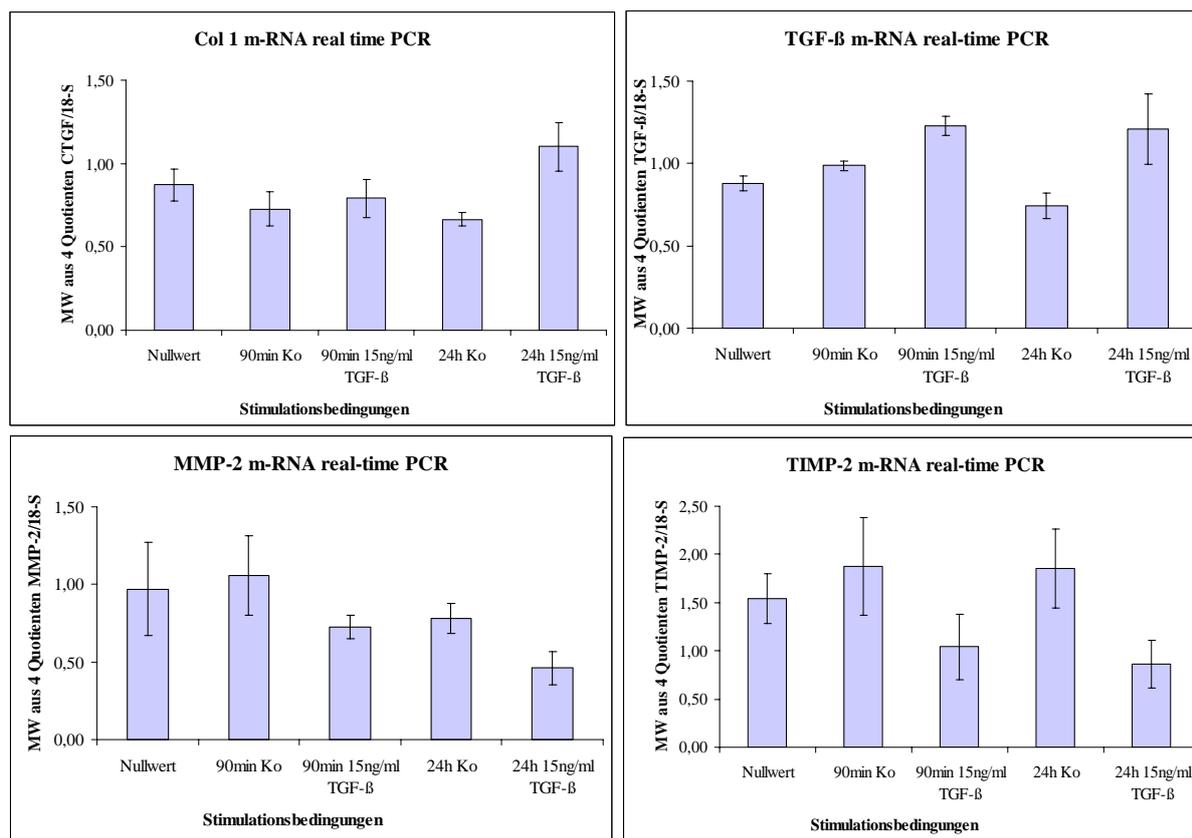


Abb. 3.2.6a-d: Stimulation der Rafibs mit TGF-β. Auswertung rT-PCR. Dargestellt sind die m-RNA Werte des jeweiligen Zielgens als Quotient mit 18-S RNA. Die Rattenfibroblasten wurden nach 24h Serumentzug für 90 min oder 24h mit 15 ng/ml TGF-β oder PBS als Kontrolle (Ko) behandelt. Die Gruppengröße betrug jeweils drei bis vier Zellkulturschalen. Es erfolgte keine Auswertung mit einem Testverfahren. Gezeigt werden neben den Nullwerten auch die Standardabweichungen für jede Gruppe.

Insgesamt konnte so gezeigt werden, dass sich verschiedene Gene durchaus in diesem System regulieren lassen und die negativen Ergebnisse aus 3.2.5 keine Systemfehler waren. Systemfehler in dem Sinne, als man hätte vermuten können, dass sich negativen Ergebnisse aus 3.2.5 nicht auf den fehlenden Einfluss von LPA auf die Genexpression der ausgewählten Gene zu den entsprechenden Zeitpunkten zurückzuführen lassen, sondern die Expression im allgemeinen in diesem Versuchsaufbau in diesen Zellen nicht zu beeinflussen wäre.

3.3 *Fehlende Regulation von Fibrose-relevanten Genen nach LPA-Stimulation auf Proteinebene*

3.3.1 TGF- β und FN-Proteinexpression ändert sich nicht nach LPA-Stimulation

Im Rahmen der LPA Stimulation der Fibroblastenzellkultur stellte sich auch die Frage nach möglichen Regulationen auf Proteinebene. So wurde parallel zu den m-RNA Untersuchungen im 3.SV mit Zellkulturüberständen ein ELISA für TGF- β und Fibronectin mit entsprechenden Antikörpern angefertigt. Die Rattenfibroblasten wurden im Dreifachansatz entweder mit 1,0 μ M oder 10 μ M LPA für 48 Stunden stimuliert und im Vergleich zu ihren Kontrollen ausgewertet. Übereinstimmend mit den m-RNA Daten fanden sich auch hier keine Regulationen auf den LPA-Stimulus hin (siehe Abb.3.3.1a & b).

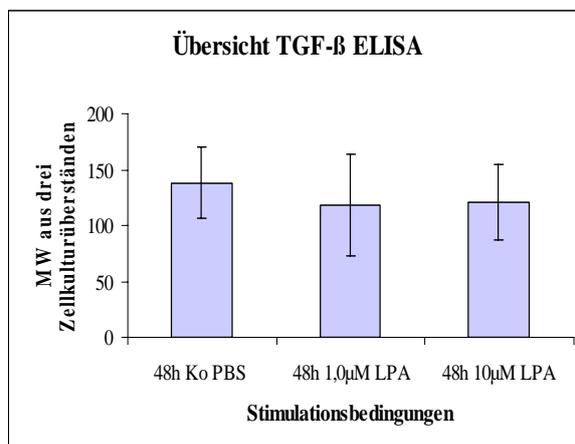


Abb. 3.3.1a: TGF- β ELISA nach LPA-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Zellkulturüberständen mit ihren Standardabweichungen. Die Rattenfibroblasten wurden mit PBS (Ko), 1,0 μ M oder 10 μ M LPA für 48h behandelt.

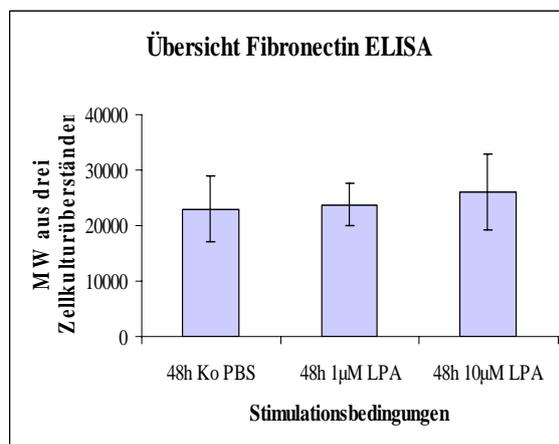


Abb. 3.3.1b: Fibronectin ELISA nach LPA-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Zellkulturüberständen mit ihren Standardabweichungen. Die Rattenfibroblasten wurden mit PBS (Ko), 1,0 μ M oder 10 μ M LPA für 48h behandelt.

3.4 *Pro-proliferative Effekte von LPA, SIP und TGF- β auf Rattenfibroblasten*

Um etwaige Zweifel an der Intaktheit des Stimulationsmodells mit LPA auf Rattenfibroblasten auszuräumen, wurden die bekannten proproliferativen Effekte von LPA auf Rattenfibroblasten mit Hilfe eines XTT-Proliferations-Assays nachgewiesen. Außerdem wurden weitere Substanzen wie SIP und TGF- β verwendet.

3.4.1 Optimierungen: Zellzahl pro well, Zeit nach Assay-Beginn, Stimuluszeit und Stimulanskonzentration

Um einen optimalen Ablauf des XTT-Proliferations-Assays zu gewährleisten, wurden im Rahmen der vom Hersteller gemachten Angaben Variationen der Zellzahl pro well, der Zeit nach Assay-Beginn sowie der Stimuluszeit und Stimulanskonzentration zu Optimierungszwecken verwendet.

Dabei zeigte sich, dass eine Zellzahl von 1.000 bis 5.000 Rattenfibroblasten pro well, bei einer Stimuluszeit von 48 Stunden im Zeitverlauf bis ungefähr 20 Stunden nach Assay-Beginn die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferte. Abweichungen von der Zellzahl nach oben, z.B. 10.000 oder 15.000 Zellen pro well führten zu inhibierenden Effekten, bzw. gar keiner Aussage. Hingegen geringere Zellzahlen wie 500 Zellen zeigten deutlich verzögerte und abgeschwächte Effekte. Bei den drei verschiedenen Stimulanzen LPA, S1P und TGF- β wurden meist zwei verschiedene Konzentrationen benutzt. Insgesamt wurden fünf Versuchsreihen (1.XTT - 5.XTT) angefertigt. Eine kürzere Stimulationszeit von 24 Stunden führte zu nicht aussagekräftigen Effekten.

3.4.2 LPA induziert die Proliferation von Rattenfibroblasten

Den deutlichsten proproliferativen Effekt von LPA auf Rattenfibroblasten in Zellkultur konnte man bei einer Zellzahl von 1.000 pro well, einer Stimulanskonzentration von 1,0 μ M und 5,0 μ M LPA und einer Stimuluszeit von 48 Stunden im Zeitverlauf des Assays feststellen. Dieses Ergebnis konnte in drei unabhängigen Versuchen gezeigt werden. Eine noch deutlichere Konzentrationsabhängigkeit konnte bei 5.000 Rafibs pro well gezeigt werden (siehe Abb. 3.4.2a & b). In Abb. 3.4.2.b ist aufgrund der geringen Anzahl der Werte keine Auswertung mit einem Testverfahren dargestellt.

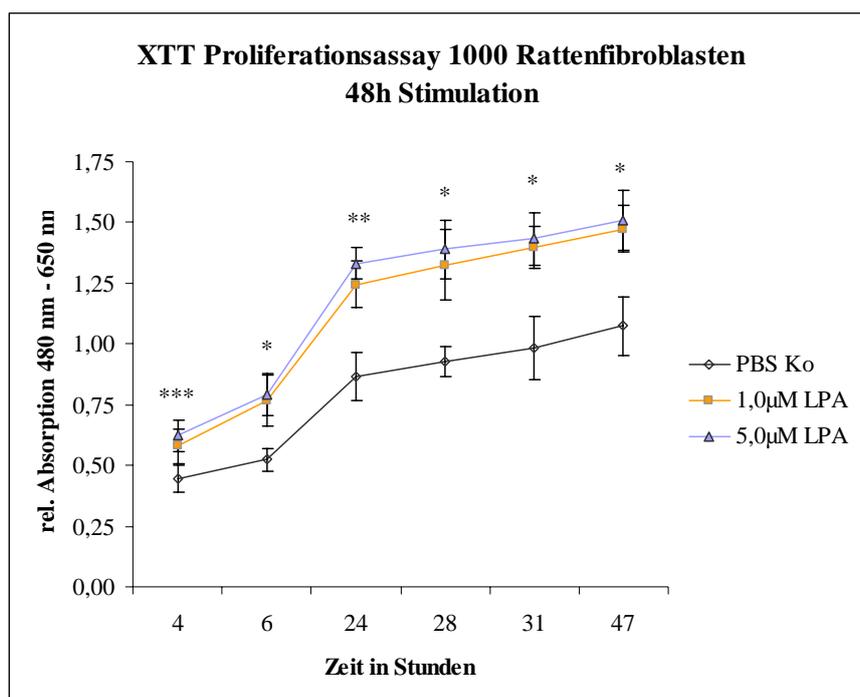


Abb. 3.4.2a: XTT Proliferations Assay im Zeitverlauf. 1000 Rattenfibroblasten pro well und 48h Stimulation mit LPA. Gemessen wurde die relative Absorptionsdifferenz von 480 nm minus 650 nm zu verschiedenen Zeitpunkten nach Assay-Beginn. Die Zellen wurden zuvor nach 24h Serumentzug entweder mit PBS (PBS Ko), mit 1µM LPA oder mit 5µM LPA für 48h inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mehreren Ansätzen mit ihren Standardabweichungen. Statistik mit dem Man-Whitney-U-Test als Vergleich zwischen mit LPA und mit PBS behandelten Rafibs: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; $n = 6$, bzw. $n = 5$. Die Signifikanzberechnungen gelten für beide LPA-Konzentrationen in Bezug auf die PBS-Kontrolle.

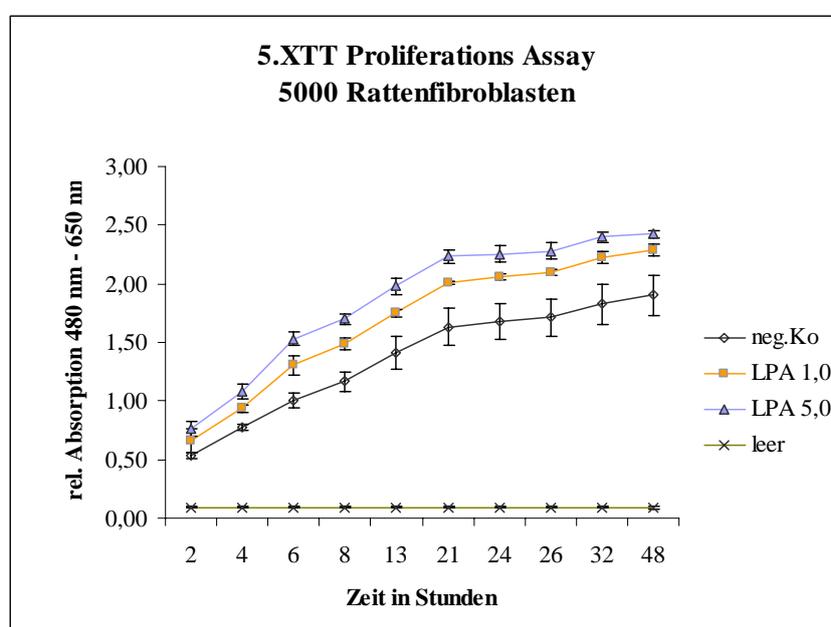


Abb. 3.4.2b: Proliferations-Assay nach LPA-Stimulus (siehe Seite zuvor). 5.XTT Proliferations-Assay mit 5000 Rattenfibroblasten pro well und 48h Stimulation mit LPA. Gemessen wurde die relative Absorptionsdifferenz von 480 nm minus 650 nm zu verschiedenen Zeitpunkten nach Assay-Beginn. Die Zellen wurden zuvor nach 24h Serumentzug entweder mit PBS (PBS Ko), mit 1µM LPA oder mit 5 µM LPA für 48h inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Ansätzen mit ihren Standardabweichungen. Aufgrund der geringen Power erfolgte keine statistische Auswertung.

3.4.3 Pro-proliferative Effekte von S1P auf Rattenfibroblasten

Für die Stimulation mit S1P wurde eine Zellzahl von 1.500 Rattenfibroblasten pro well verwendet, die für 48h mit 1,0 μM S1P stimuliert wurden. Aufgrund technischer Probleme konnte der Versuch nicht aussagekräftig wiederholt werden. S1P diente neben TGF- β vor allem als Kostimulans für LPA. Es konnte aber gezeigt werden, dass auch S1P allein pro-proliferative Effekt besitzt (siehe Abb. 3.4.3). Höhere Konzentrationen von S1P führten zu keiner stärkeren Proliferation. Die Methanol Kontrolle (MetOH) war zur Überprüfung von Lösungsmittelleffekten bei S1P-Stimulation notwendig.

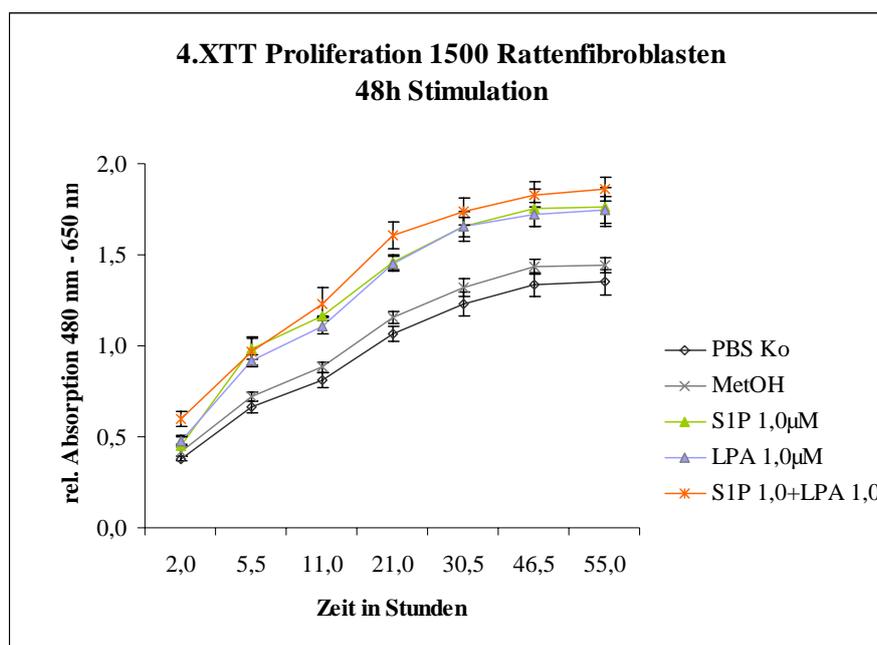


Abb. 3.4.3: XTT Proliferations Assay nach S1P und LPA-Stimulus. 4.XTT Proliferations-Assay mit 1500 Rattenfibroblasten pro well und 48h Stimulation mit LPA und/oder S1P. Gemessen wurde die relative Absorptionsdifferenz von 480 nm minus 650 nm zu verschiedenen Zeitpunkten nach Assay-Beginn. Die Zellen wurden zuvor nach 24h Serumentzug entweder mit PBS (PBS Ko), Methanol (MetOH), 1 μM S1P, 1 μM LPA oder mit 1 μM S1P plus 1 μM LPA für 48h inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Ansätzen mit ihren Standardabweichungen. Aufgrund der geringen Power erfolgte keine statistische Auswertung.

3.4.4 TGF- β stimuliert die Proliferation von Rattenfibroblasten

Bei denen unter 3.4.1 gewählten Bedingungen führte eine Stimulation der Zellkultur mit 10 ng/ml TGF- β bei sowohl für 1.000 wie auch für 5.000 Zellen pro well nach 48 Stunden Inkubation zu einer deutlichen Zunahme der Proliferationsraten (siehe Abb. 3.4.4).

TGF- β diente vor allem als Positivkontrolle im Vergleich zur Stimulation der Rattenfibroblasten mit LPA.

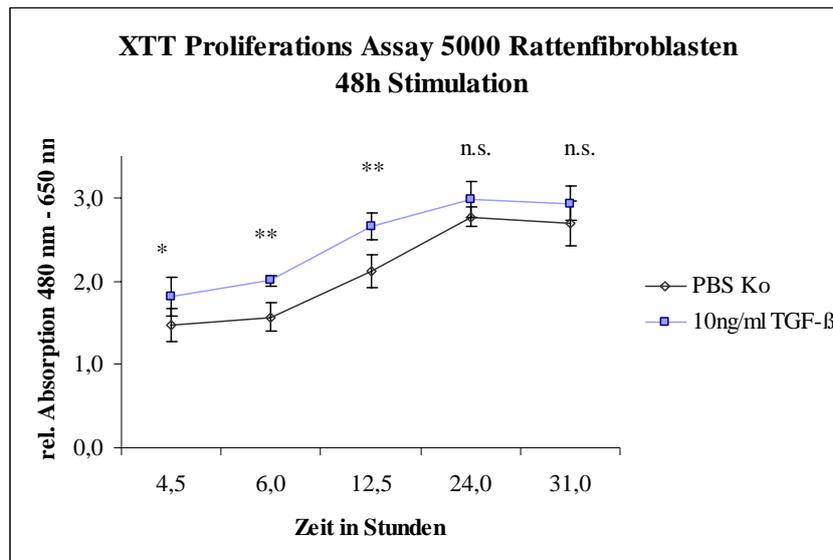


Abb. 3.4.4: XTT-Proliferations-Assay nach TGF-β Stimulus. 5000 Rattenfibroblasten pro well und 48h Stimulation. Gemessen wurde die relative Absorptionsdifferenz von 480 nm minus 650 nm zu verschiedenen Zeitpunkten nach Assay-Beginn. Die Zellen wurden nach 24h Serumentzug entweder mit PBS (PBS Ko) oder mit 10 ng/ml TGF-β behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mehreren Ansätzen mit ihren Standardabweichungen. Die Statistik erfolgte mit dem Man-Whitney-U-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; n.s. – nicht signifikant. $n=6$, bzw. $n=5$.

3.4.5 Kostimulationen

Wie bereits erwähnt wurde der LPA-Stimulus wahlweise mit S1P oder TGF-β kombiniert. Diese Kostimulationen zeigten bei 48 Stunden Inkubation einer Zellzahl von 1.500 Rattenfibroblasten proproliferative Wirkungen. Es konnte jedoch keine Dosisabhängigkeit oder Addition der Einzeleffekte gezeigt werden (siehe Abb.3.3.1 - Abb.3.3.4).

3.5 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation

3.5.1 Darstellung der Rattenfibroblasten während LPA Stimulation

Um der Frage nachzugehen, ob die Rattenfibroblasten während der Stimulation mit LPA und TGF- β evtl. morphologische Unterschiede bereits lichtmikroskopisch aufwiesen, wurden die Zellkulturschalen vor Serumentzug, nach Serumentzug und während der Stimulation in regelmäßigen Abständen mit Hilfe einer Kamera auf einem Lichtmikroskop fotografiert.

Dabei waren vor allem die morphologischen Veränderungen durch den Serumentzug zu erkennen. Reaktionen der Zellen auf die Stimulation waren mit dieser Methode bei keiner der beiden Stimulanzien zu detektieren. Auch noch kürzere Zeitpunkte zeigten keine mit dieser Methode darstellbaren Veränderungen (siehe Abb.3.5.1c - n.). Auffallend waren das langsamere Wachstum und die morphologischen Veränderungen der Rattenfibroblasten in höheren Passagen zu einem breiteren Erscheinungsbild (siehe Abb.3.5.1a & b).

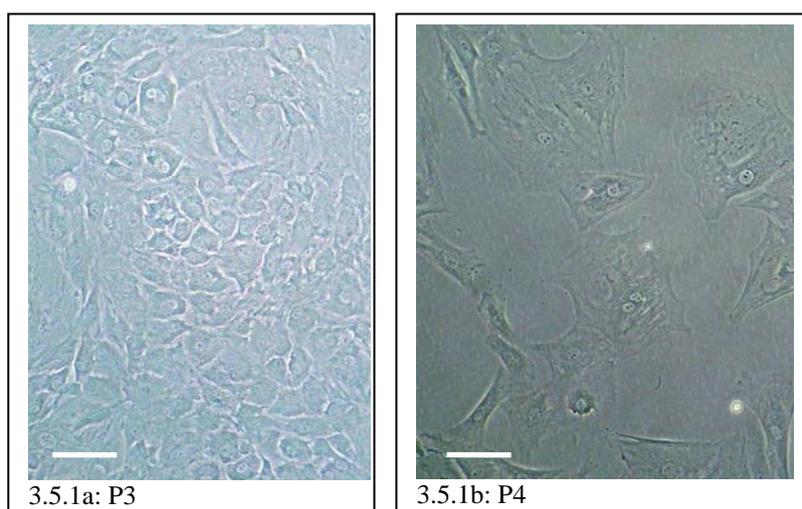
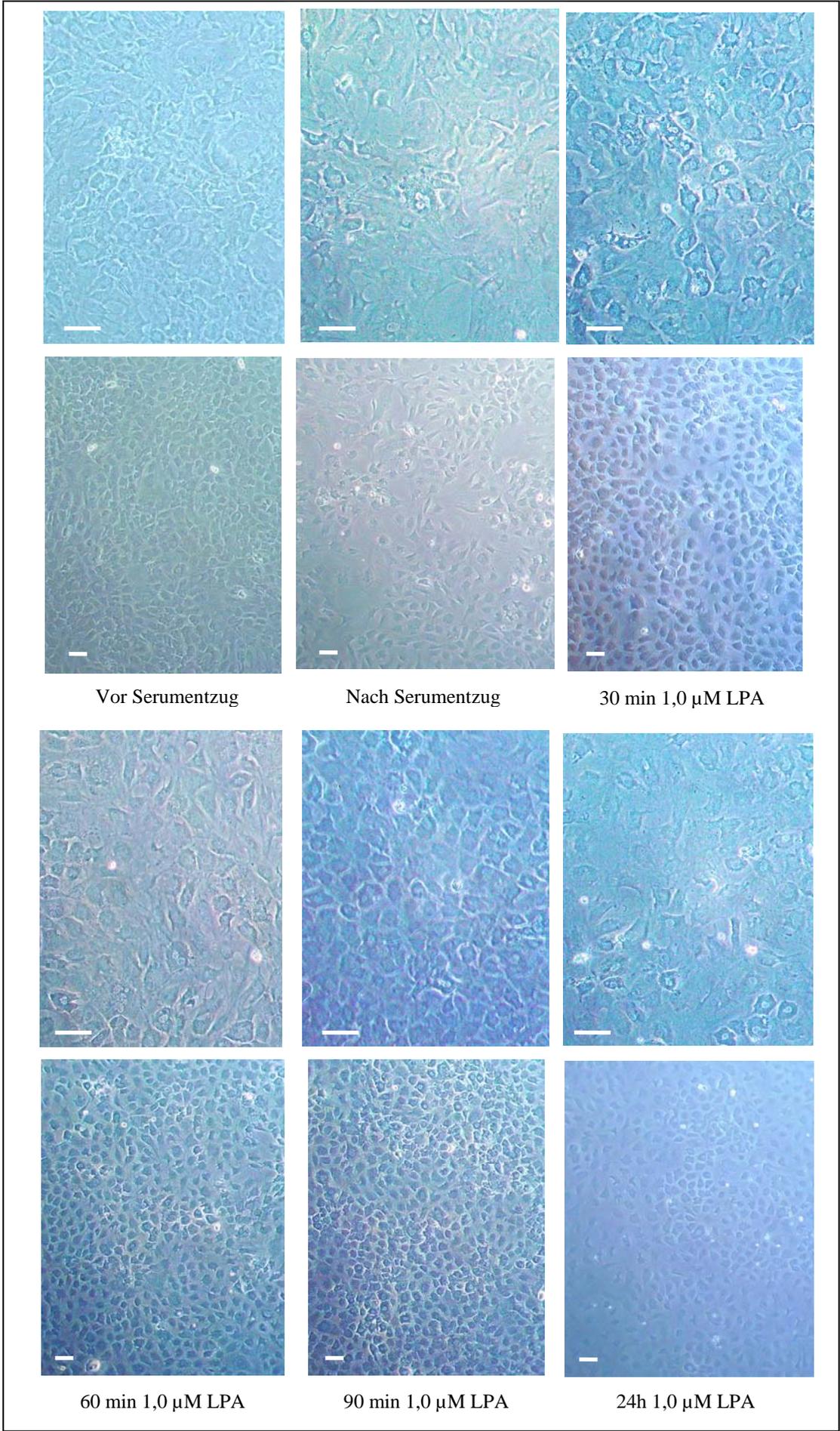


Abb. 3.5.1a & b: Morphologische Veränderungen von Rattenfibroblasten. Dargestellt sind exemplarisch Rattenfibroblasten aus den Passagen drei (P3) und vier (P4) im Lichtmikroskop. Auffällig ist das breitere morphologische Erscheinungsbild neben der sehr viel langsameren Wachstumsgeschwindigkeit (nicht dargestellt). Am linken Rand befindet sich eine weiße Größenorientierung mit der Kantenlänge 0,1 mm.

Abbildungen 3.5.1 c - n auf nächster Seite: Fotoserie während LPA Stimulation: Dargestellt sind repräsentative Bereiche der Zellkulturschalen während des 8.SV zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Stimulationsbedingungen und Zeitpunkte sind unter jeder Spalte genannt. Im oberen Teil der Graphik Rattenfibroblasten vor und nach Serumentzug sowie nach 30min 1 μ M LPA. Im unteren Teil der Graphik Rattenfibroblasten nach 60 min, 90 min und 24h Stimulation mit 1 μ M LPA.

In jeder Spalte sind zwei unterschiedlich große Abbildung (Vergrößerung 40x, darunter 20x) zum selben Zeitpunkt gezeigt. In jeder Abbildung befindet sich eine entsprechende Größenorientierungen: Die Länge der weißen Balken beträgt jeweils 0,1 mm.



3.5.2 Rattenmyokard HE-Färbung

Die für die Fibroblastenextraktion verwendeten Myokardstücke aus den Herzen der phänotypisch gesunden Wistar Ratten wurden mit Hilfe der HE-Färbung auch histologisch klar als gesundes Herzgewebe identifiziert. Man kann die typische Struktur von Primär- und Sekundärbündeln erkennen, sowie die verzweigten Muskelfasern, die Glykogenspeicher, das typische Bandenmuster und die peripher liegenden Zellkerne (siehe Abb. 3.5.2a & b).

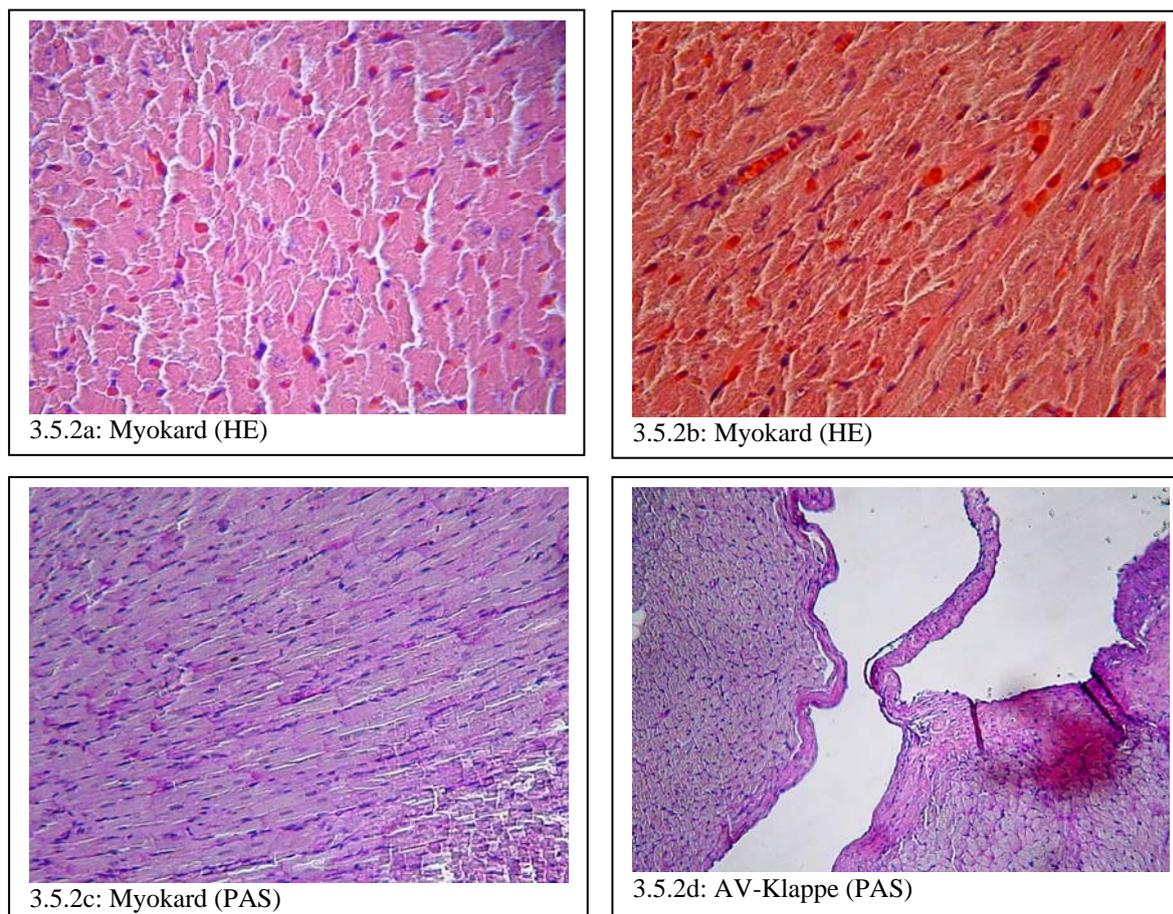


Abb. 3.5.2a – d: HE und PAS-Färbung von Herzparaffinschnitten aus 5 Wo alten Wistar Ratten: Oben HE-Färbung. Oben links a: Bündelstruktur im Querschnitt – Cohnheim'sche Felderung. **Oben rechts b:** längs und quer getroffene Herzmuskelbalken. **Unten PAS-Färbungen. Unten links c:** Ausschnitt längs getroffener Herzmuskelzellen. **Unten rechts d:** Übersicht des Atrioventrikularbereichs mit Klappenapparatur.

3.5.3 Rattenmyokard PAS-Färbung

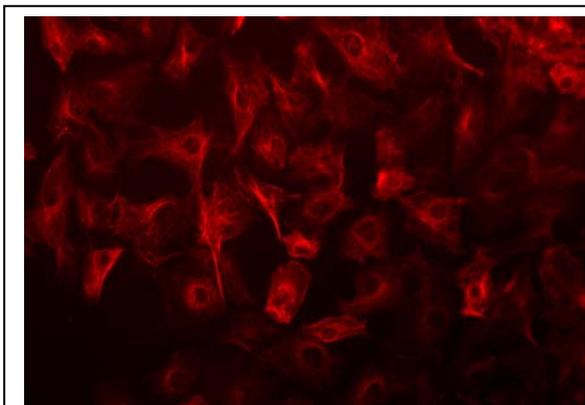
Genau wie die HE-Färbung zeigte die PAS-Färbung derselben Myokardproben gesundes Herzgewebe, das keinen fibrotischen Umbau aufwies. Die Proben stammten aus Rattenherzen, die für die Fibroblastenzellkultur verwendet wurden.

Deutlich zu erkennen sind die Unterschiede zwischen mehr bindegewebigen Strukturen des Vorhofs verglichen mit der klaren Herzmuskelstruktur der Ventrikel. Außerdem kann man gut die Atrioventrikularklappe erkennen (siehe Abb. 3.5.2c & d).

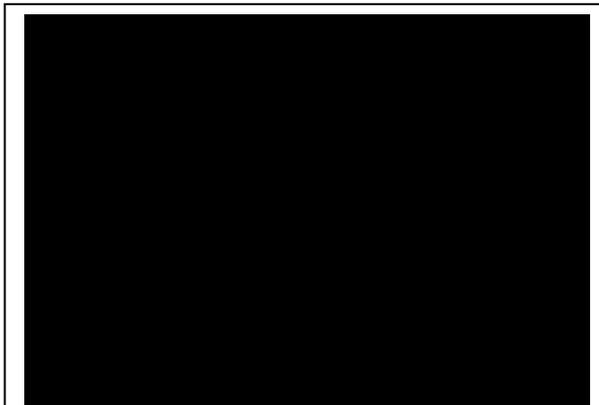
3.5.4 Charakterisierung der isolierten Zellen - Immunfluoreszenz

Zusätzlich zu den lichtmikroskopisch gewonnenen Eindrücken der isolierten Rattenfibroblasten sollte die Reinheit der Zellkultur und der Fibroblastenstatus mit Hilfe von immunhistologischen Verfahren nachgewiesen werden. Dazu wurden der Anti-Vimentin-Antikörper zum Nachweis von Fibroblasten und der Anti-von-Willebrandt-Faktor-Antikörper zum Nachweis von Endothelzellen mit fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörpern verwendet. Als Positivkontrolle für den Anti-vWF-Ak dienten humane Endothelzellen.

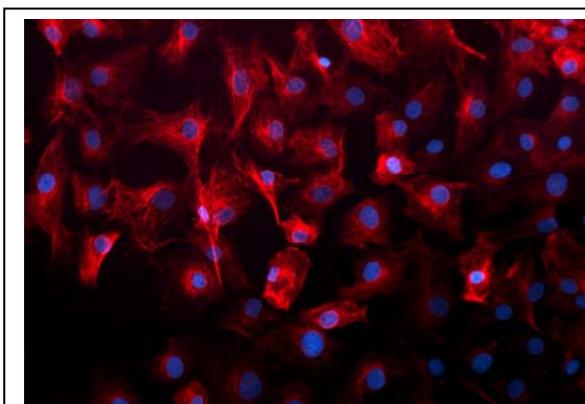
Es konnte einwandfrei gezeigt werden, dass es sich bei denen aus Rattenherzen isolierten Zellen um Fibroblasten handelte, außerdem konnte der hohe zellspezifische Reinheitsgrad der gewonnenen Fibroblastenkultur nachgewiesen werden (siehe Abb.3.5.4 a - c).



3.5.4a: Anti-Vim-Ak & Cy3



3.5.4b: Anti-vWF-Ak & FITC



3.5.4c: Anti-Vim-Ak, Cy3, DAPI

Abb. 3.5.4a-c: Charakterisierung der Fibroblasten. Der Anti-vWF-Antikörper ist laut Herstellerangaben gegen humanes wie Rattengewebe gerichtet. **3.5.4a:** Rafibs mit 1.Ak Anti-Vim 1:100 und 2.Ak Cy3 1:100 Aufnahme: 20x 0,2sec. **3.5.4b:** Rafibs mit 1.Ak Anti-vWF 1:200 und 2.Ak FITC 1:100 Aufnahme: 20x 0,5sec. **3.5.4c:** „overlay“ von Anti-Vimentin + Anti-vWF mit zusätzlich DAPI-Färbung 1:20.000 für 0,05 sec. Sowohl die negativ Kontrolle ohne 1.Ak wie auch die Autofluoreszenzkontrolle waren schwarz.

Die Anwendung der beiden Antikörper auf humanen Endothelzellen zeigte, dass sich Endothelzellen mit diesem Anti-vWF-Ak detektieren lassen, aber nicht in der Rattenfibroblastenkultur vorhanden waren (siehe Abb.3.5.4 d - g).

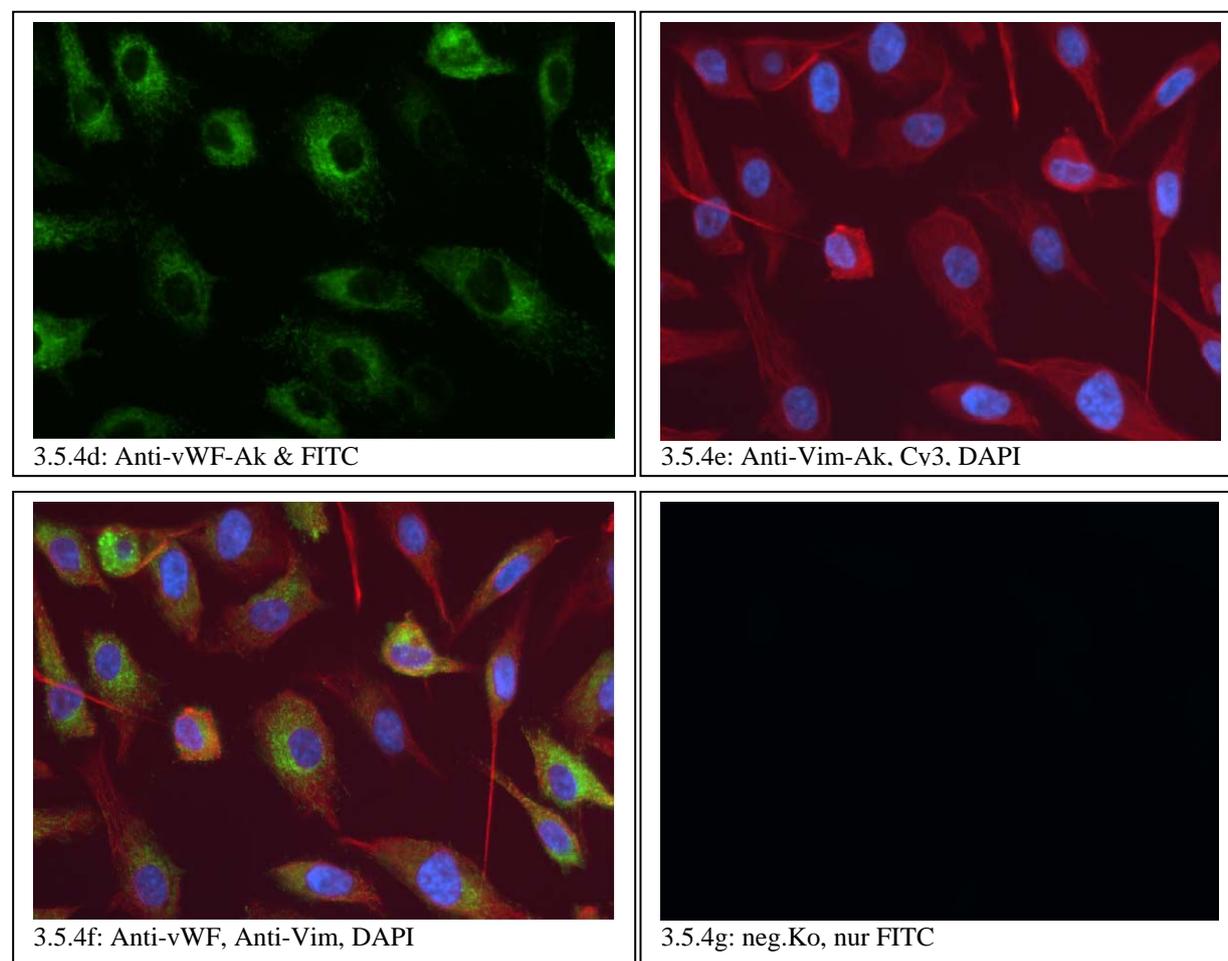


Abb. 3.5.4d – g: Charakterisierung II – Humane Endothelzellen als Positivkontrolle.

Abb. 3.5.4d: Endothelzellen mit 1.Ak Anti-vWF 1:200 und 2.Ak FITC 1:100 Aufnahme: 40x 0,1sec.

Abb. 3.5.4e: Endothelzellen mit 1.Ak Anti-Vim 1:100 und 2.Ak. Cy3 1:100 Aufnahme: 40x 0,06sec im „overlay“ mit DAPI 1:20.000 Aufnahme: 40x 0,02sec.

Abb. 3.5.4f: Triple-layer: Anti-vWF + Anti-Vimentin + DAPI; Konzentration und Aufnahme wie zuvor.

Abb. 3.5.4g: Kein 1.Ak nur FITC 1:100 Aufnahme: 40x 0,5sec.

Ebenso schwarz war die negativ Kontrolle mit beiden Zweitantikörpern. Die beiden Antikörper Anti-von-Willebrandt-Ak und Anti-Vimentin-Ak waren sowohl gegen humanes Material wie auch gegen Ratten-Material reaktiv vom Hersteller beschrieben. Die Autofluoreszenz-Kontrollen waren schwarz.

3.5.5 Darstellung von EDG-1 und EDG-2 auf Fibroblasten- Immunfluoreszenz

Um der Frage nachzugehen, in welchen Kompartimenten die EDG-Rezeptoren in der Zelle lokalisiert sind, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der Rattenfibroblasten, HT1080 und HFL-1 Zellen mit Antikörpern gegen EDG-1 und EDG-2 angefertigt. Es zeigte sich, dass EDG-1 mehr im Zytoplasma und EDG-2 mehr im Zellkern lokalisiert waren (siehe Abb.3.5.5 a-f).

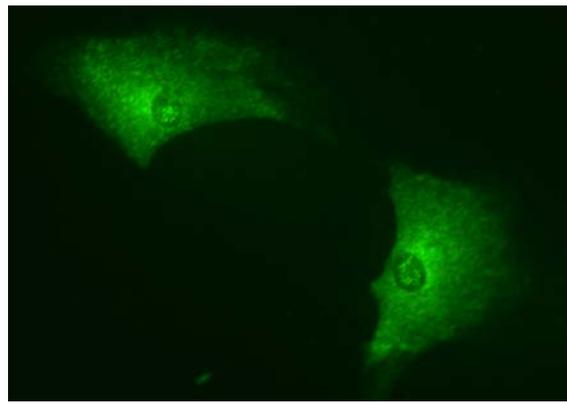


Abb 3.5.5a: Rafibs EDG-1

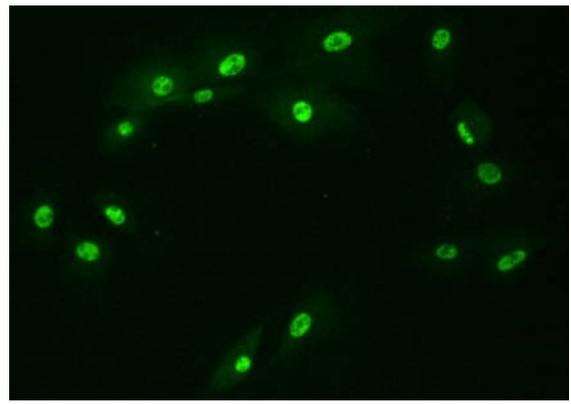


Abb.3.5.5b: Rafibs EDG-2

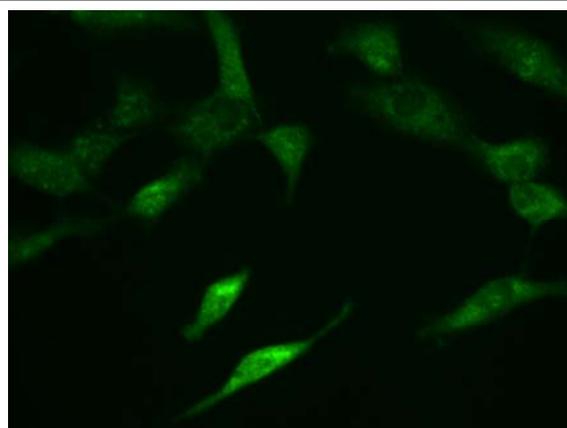


Abb. 3.5.5c: HT1080 EDG-1

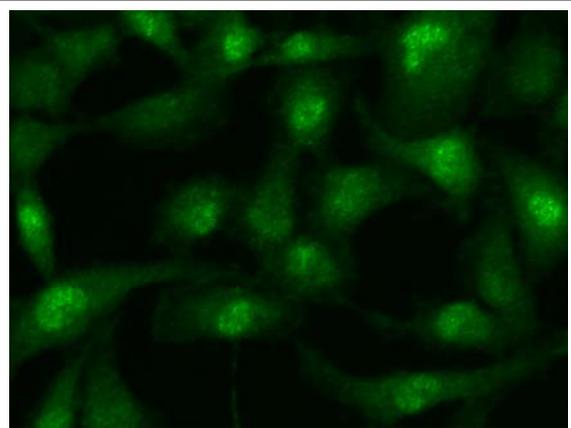


Abb. 3.5.5d: HT1080 EDG-2

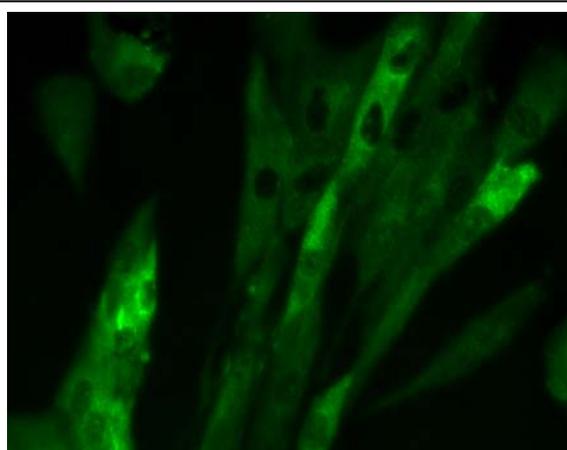


Abb. 3.5.5e: HFL-1 EDG-1

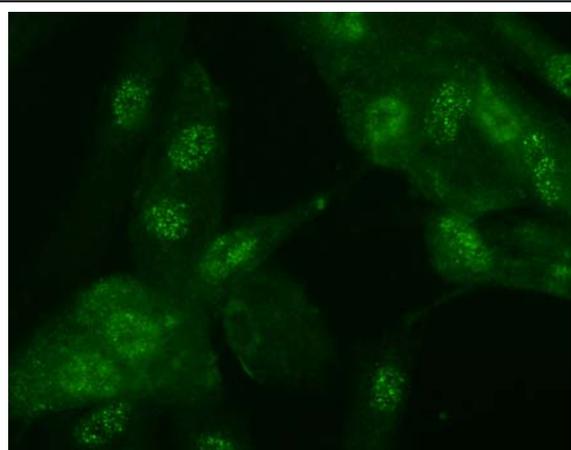


Abb. 3.5.5f: HFL-1 EDG-2

Abb. 3.5.5a – f: EDG-1 & EDG-2 in verschiedenen Fibroblasten-Arten. **3.5.5a** : Rafibs P2 mit 1.Ak Anti-EDG-1 1:100 und 2.Ak FITC 1:100 Aufnahme: 40x 5,05sec. **3.5.5b**: Rafibs P1 mit 1.Ak Anti-EDG-2 1:100 und 2.Ak. FITC 1:100 Aufnahme 20x 3sec. **3.5.5c**: HT1080 mit 1.Ak. Anti-EDG-1 1:100 und 2.Ak. FITC 1:100 Aufnahme: 40x 4sec. **3.5.5d**: HT1080 mit 1.Ak. Anti-EDG-2 1:100 und 2.Ak. FITC 1:100 Aufnahme: 40x 5sec. **3.5.5e**: HFL-1 Zellen mit 1.Ak Anti-EDG-1 1:100 und 2.Ak FITC 1:100 Aufnahme: 40x 1sec. **3.5.5f**: HFL-1 Zellen mit 1.Ak. Anti-EDG-2 1:100 und 2.Ak. FTIC 1:50 Aufnahme: 63x 1,7sec Gain 15. Alle Negativ- und Autofluoreszenz-Kontrollen waren schwarz.

3.5.6 PCNA und EDG-2 über P1-P5 auf Rattenfibroblasten - Immunfluoreszenz

Im Zusammenhang mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen, dass sich die Rattenfibroblasten höherer Passagen langsamer entwickeln, entstand die Frage, ob sich evtl. auch die Rezeptor-Expression von EDG-2 in verschiedenen Zellkulturpassagen unterschiedlich darstellt. Um diese Frage zu beantworten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen EDG-2 und einem Proliferationsmarker PCNA angefertigt. Es konnten jedoch keine wesentlichen Verteilungsveränderungen des Rezeptorexpressionsmusters dargestellt werden (siehe Abb.3.5.6a - d).

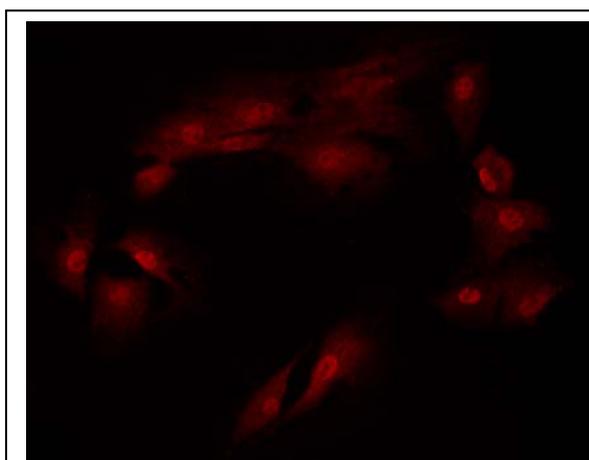


Abb. 3.5.6a: Rafibs P2 PCNA

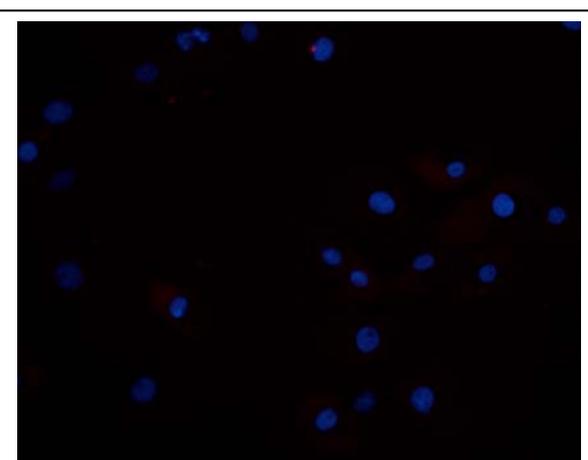


Abb. 3.5.6b: neg. Ko Cy3 nur DAPI

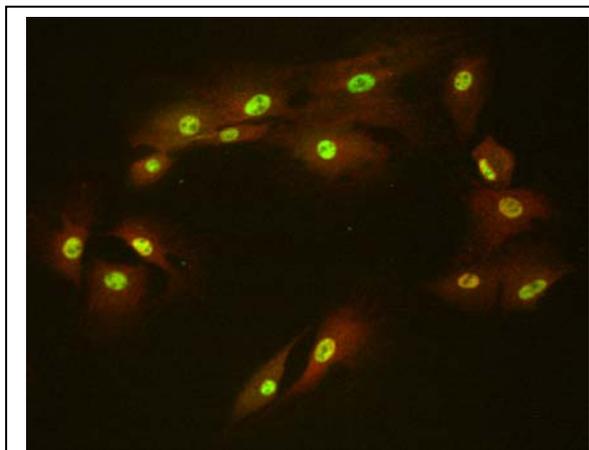


Abb. 3.5.6c: Rafibs P2 EDG-2 und PCNA

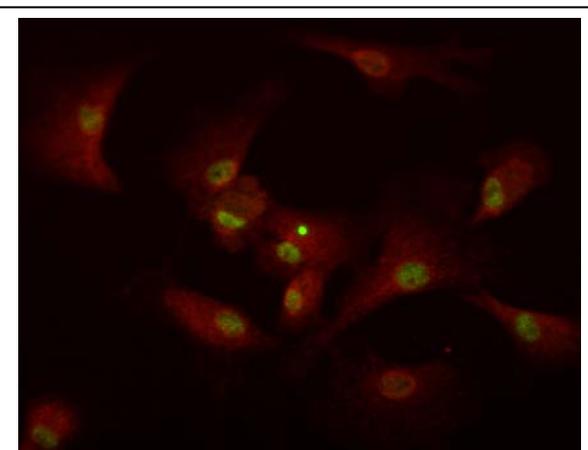


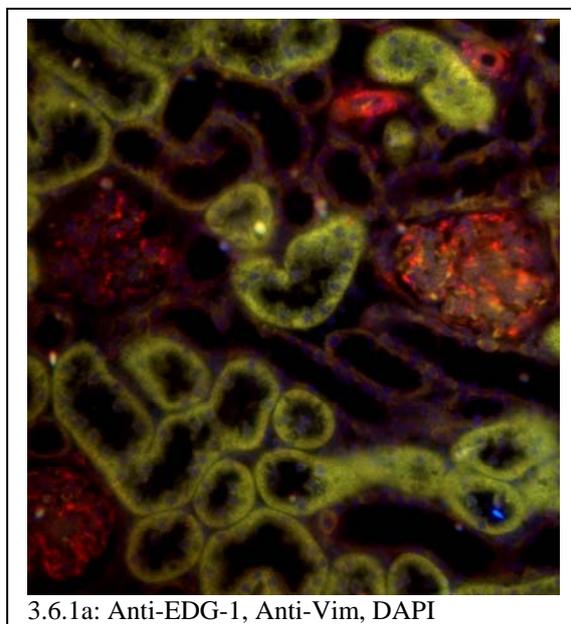
Abb. 3.5.6d: Rafibs P5 EDG-2 und PCNA

Abb. 3.5.6a - d: EDG-2 in Abhängigkeit von Passage und Proliferation. **3.5.6a:** Rafibs P2 1.Ak PCNA 1:200 mit 2.Ak. Cy3 1:100 Aufnahme: 20x 0,351sec. **3.5.6b:** Rafibs P2 neg. Kontrolle für PCNA, d.h. nur 2.Ak. Cy3 1:100 bei 20x 0,5sec im „overlay“ mit DAPI 1:20.000 Aufnahme: 20x 0,008sec. **3.5.6c:** „overlay“ von Abb. 3.5.6a mit EDG-2 1:100 und 2.Ak FITC 1:100 Aufnahme: 20x 1sec. **3.5.6d:** Rafibs P5 1.Ak PCNA 1:100 2.Ak Cy3 1:100 Aufnahme: 20x 1,5 1sec im „overlay“ mit 1.Ak Anti-EDG-2 1:50 und 2.Ak FITC 1:100 Aufnahme: 20x 1,5 0,5sec. Bilder aus den Passagen P1, P3, P4 nicht dargestellt. Dargestellte Abbildungen sind repräsentativ, Negativkontrollen waren schwarz.

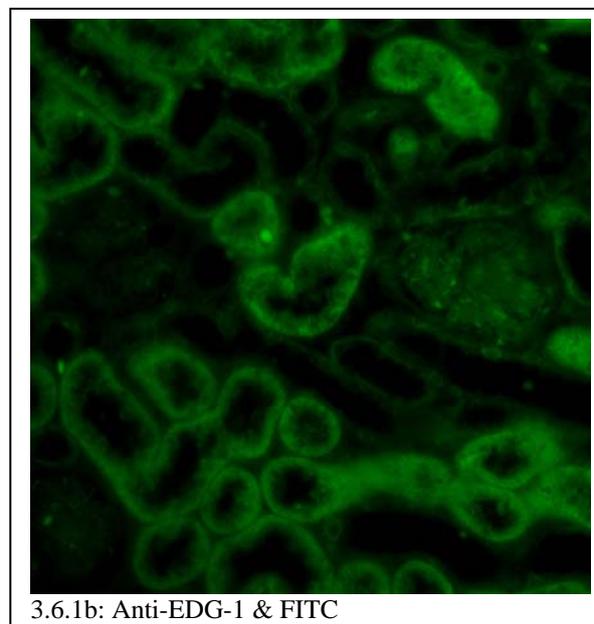
3.6 Bedeutung von *EDG-1* bei der *anti-THY1*-induzierten chronisch progredienten Glomerulosklerose

3.6.1 *EDG-1* in Ratten-Nierenparaffinschnitten - Immunfluoreszenz

Das *EDG-1* Protein wird im gesunden Nierengewebe der Ratte exprimiert. Dabei ist ein bestimmtes Expressionsmuster auffällig: Vor allem das Tubulussystem zeigte in der Immunfluoreszenz *EDG-1* positive Signale. Glomeruläre Strukturen zeigten überwiegend keine oder nur eine sehr viel geringere Expression von *EDG-1* im Vergleich zu den tubulären Strukturen (siehe Abb.3.6.1a - d). Fibroblasten ließen sich mit Hilfe des Anti-Vimentin-Antikörpers *va.* im Aufhängesystem der Glomerulusschlingen sowie in der Adventitia der Gefäße nachweisen (siehe Abb. 3.6.1a).



3.6.1a: Anti-*EDG-1*, Anti-Vim, DAPI



3.6.1b: Anti-*EDG-1* & FITC

Abb. 3.6.1a & b: Übersicht der *EDG-1* Expression in gesundem Nierengewebe der Ratte.

3.6.1a: Kofärbung der *EDG-1* Färbung aus 3.6.1b in grün mit DAPI (1:20.000) in blau und Vimentin (1:500)/Cy3(1:100) in rot; Nierenparaffinschnitt. **3.6.1b:** 1.Ak *EDG-1* (1:100) 2.Ak FITC (1:100) 20x 700ms; Negativ-Kontrollen schwarz; Nierenparaffinschnitt.

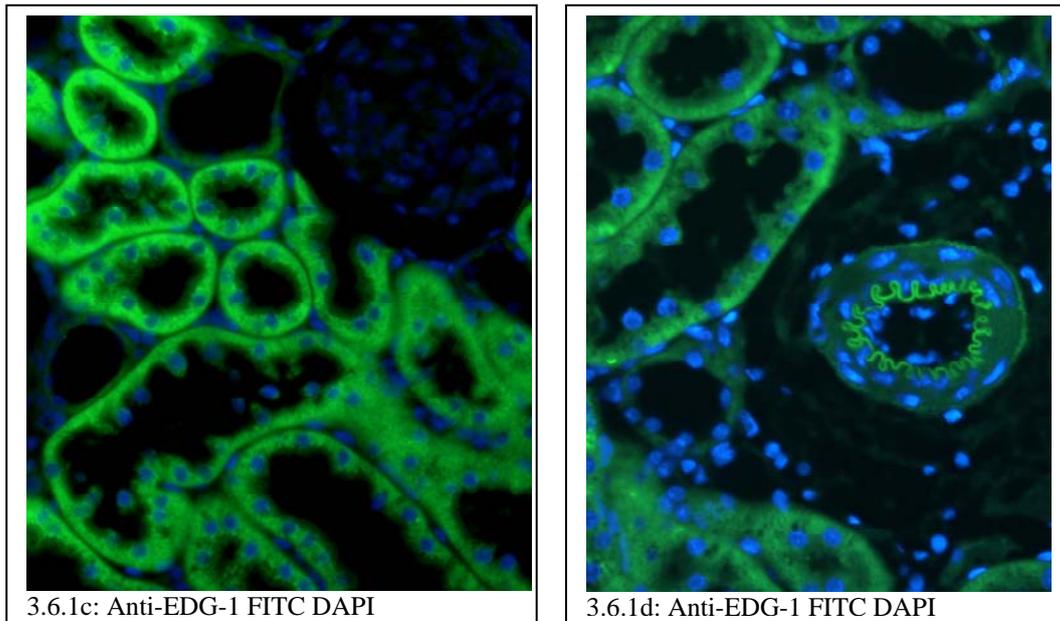


Abb. 3.6.1c & d: EDG-1 Expression im gesunden Nierengewebe der Ratte. **3.6.1c:** Kofärbung 1.Ak Anti-EDG-1 (1:100) 2.Ak FITC (1:100) 40x 700ms mit DAPI (1:20.000). Charakteristisches EDG-1 Expressionsmuster der Rattenniere im Paraffinschnitt. **3.6.1d:** Kofärbung 1.Ak Anti-EDG-1 (1:100) 2.Ak FITC (1:100) 40x 700ms mit DAPI (1:20.000). Neben verschiedenen Tubuli ist ein Gefäß mit autofluoreszierender Elastica interna et externa dargestellt.

3.6.2 Tubulär betonte Lokalisation von EDG-1 bei anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose

Mit Hilfe des APAAP Färbesystems konnte für EDG-1 in Nieren von Ratten mit anti-THY-1 induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose eine tubuläre Lokalisation des Rezeptorproteins nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang war auffällig, dass nur distale Tubulusabschnitte EDG-1 exprimierten, während andere Tubulusabschnitte sowie Glomeruli kein EDG-1 positives Signal aufwiesen. In den Kontrolltieren war auch eine EDG-1 Expression in den Glomeruli nachweisbar. Dieses tubuläre Expressionsmuster von EDG-1 zeigte innerhalb der Zellen eine basozelluläre Lokalisation.

Deutlich zu erkennen sind außerdem die erkrankungsbedingten Schäden der Nieren bei Tieren mit anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose: geweitete Glomeruli, bzw. Bowmann'sche Kapseln, weite Lumina der Tubuli und Anzeichen fibrotischer Umbauprozesse (siehe Abb. 3.6.2 a-f).

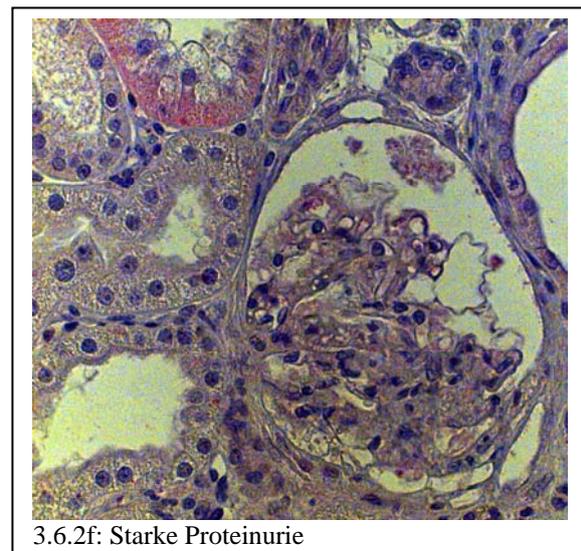
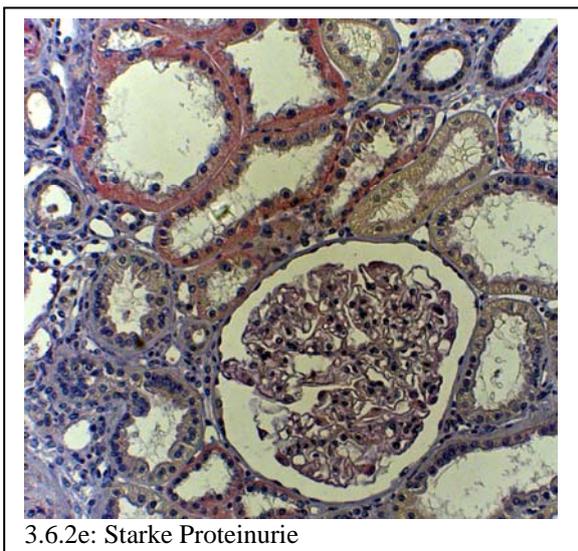
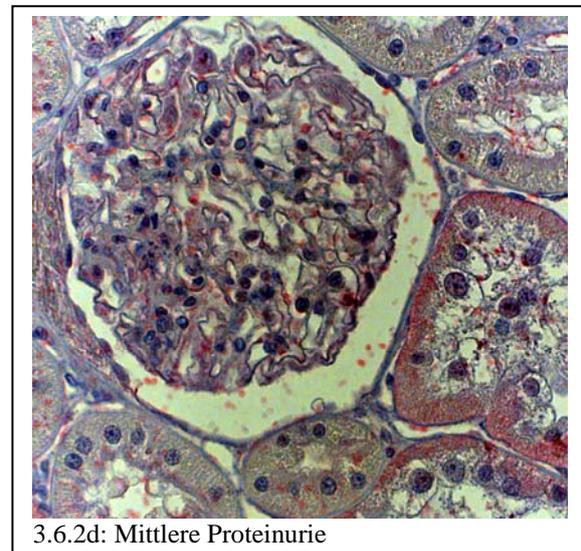
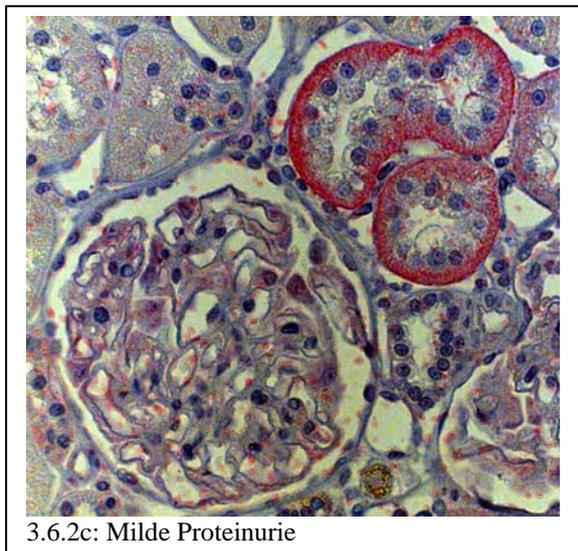
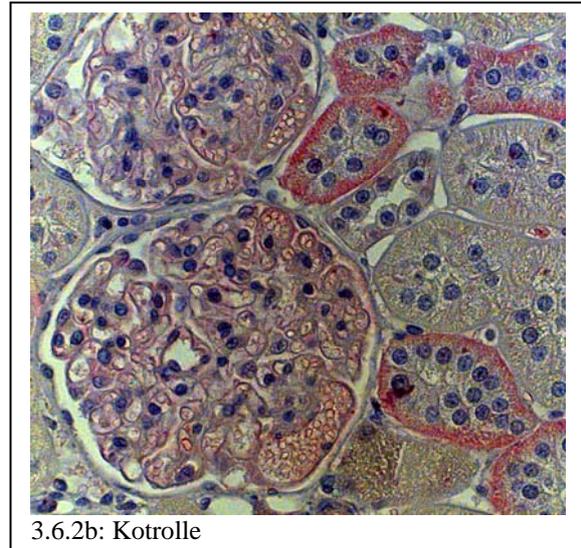
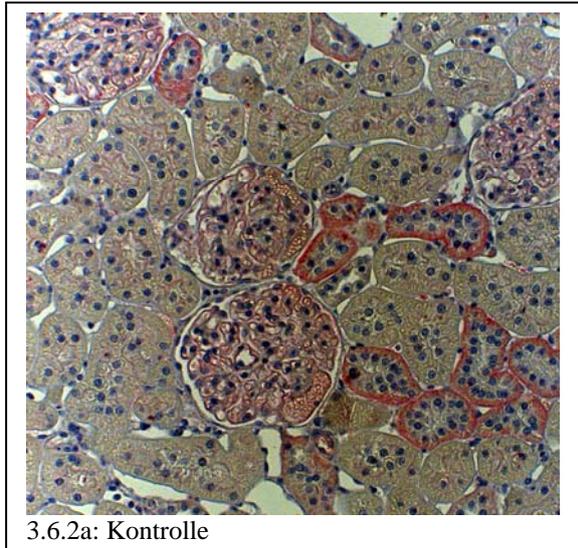


Abb. 3.6.2a – f: EDG-1 – APAAP anti-THY-1-induzierte chronisch progrediente Glomerulosklerose (cGSC). **3.6.2a:** Übersicht 20x Kontrollen. **3.6.2b:** 40x Vergrößerung Kontrollen. **3.6.2c:** 40x Vergrößerung; cGSC mit milder Proteinurie 200-300mg/24h. **3.6.2d:** 40x Vergrößerung; cGSC mit mittlerer Proteinurie 400mg/24h. **3.6.2e:** Übersicht 20x; cGSC mit starker Proteinurie. **3.6.2f:** 40x Vergrößerung; cGSC mit starker Proteinurie 500-650mg/24h. Die Bereiche sind repräsentativ ausgewählt und dargestellt.

In Abbildung 3.6.2a-f sind repräsentative Bereiche aus dem Nierenkortex von Tieren mit cGSC dargestellt. Variationen der Helligkeit und Qualität sind aufnahmebedingt und nicht aussagerelevant.

3.6.3 Verminderte EDG-1 Proteinexpression bei Proteinurie in anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose

Die Proteinexpression von EDG-1 im Nierengewebe mit anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose zeigte tendenziell eine deutliche Abnahme bei steigenden Proteinuriewerten verglichen mit den Kontrollen (siehe Abb. 3.6.3). Die Einteilung der Proteinuriewerte erfolgte in mild (200-300mg/24h), mittel (<400mg/24) und stark (500-650mg/24h) mit Hilfe einer modifizierten Pyrogallol-Rot-Färbung [65]. Dargestellt sind die Werte für EDG-1 aus dem Western Blot; dabei wurde die EDG-1 Expression auf Gesamtprotein normiert und mit GAPDH kontrolliert.

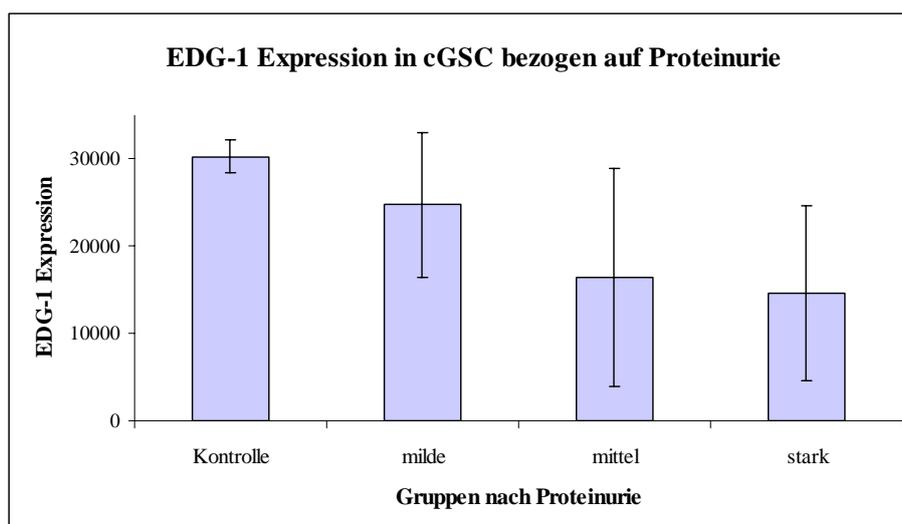


Abb. 3.6.3: EDG-1 Expression in anti-THY-1-induzierter cGSC nach Proteinuriewerten. EDG-1 Expression bei Kontrollen und Tieren mit milder (200-300 mg/ 24h), mittlerer 400mg/24h) und starker (500-650 mg/ 24h) Proteinurie. Jede der drei Gruppen bestand aus fünf Tieren, die Kontrollgruppe aus zwei. Aufgrund fehlender Power bei zu geringen Gruppengrößen wurde keine statistische Auswertung vorgenommen.

3.6.4 Die anti-THY-1-induzierte chronische GSK bleibt ohne Auswirkung auf die EZM-Zusammensetzung des Rattenmyokards - Sirius-Red-Färbung

Mit Hilfe der Sirius Red Färbung sollte geklärt werden, ob die Herzen von Ratten mit anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose aufgrund des leichten renalen Hypertonus auch fibrotische Umbauprozesse am Herzen entwickeln [56, 65, 66]. Eine vermehrte Anlagerung von Bindegewebe konnte nur physiologisch in der Adventitia um Gefäße, im EZR

und am Klappen-Halteapparat nachgewiesen werden. Es zeigten sich keine bedeutenden fibrotischen Umbauprozesse im Vergleich mit Färbungen von Herzen nierengesunder Ratten (siehe Abb. 3.6.4a - f).

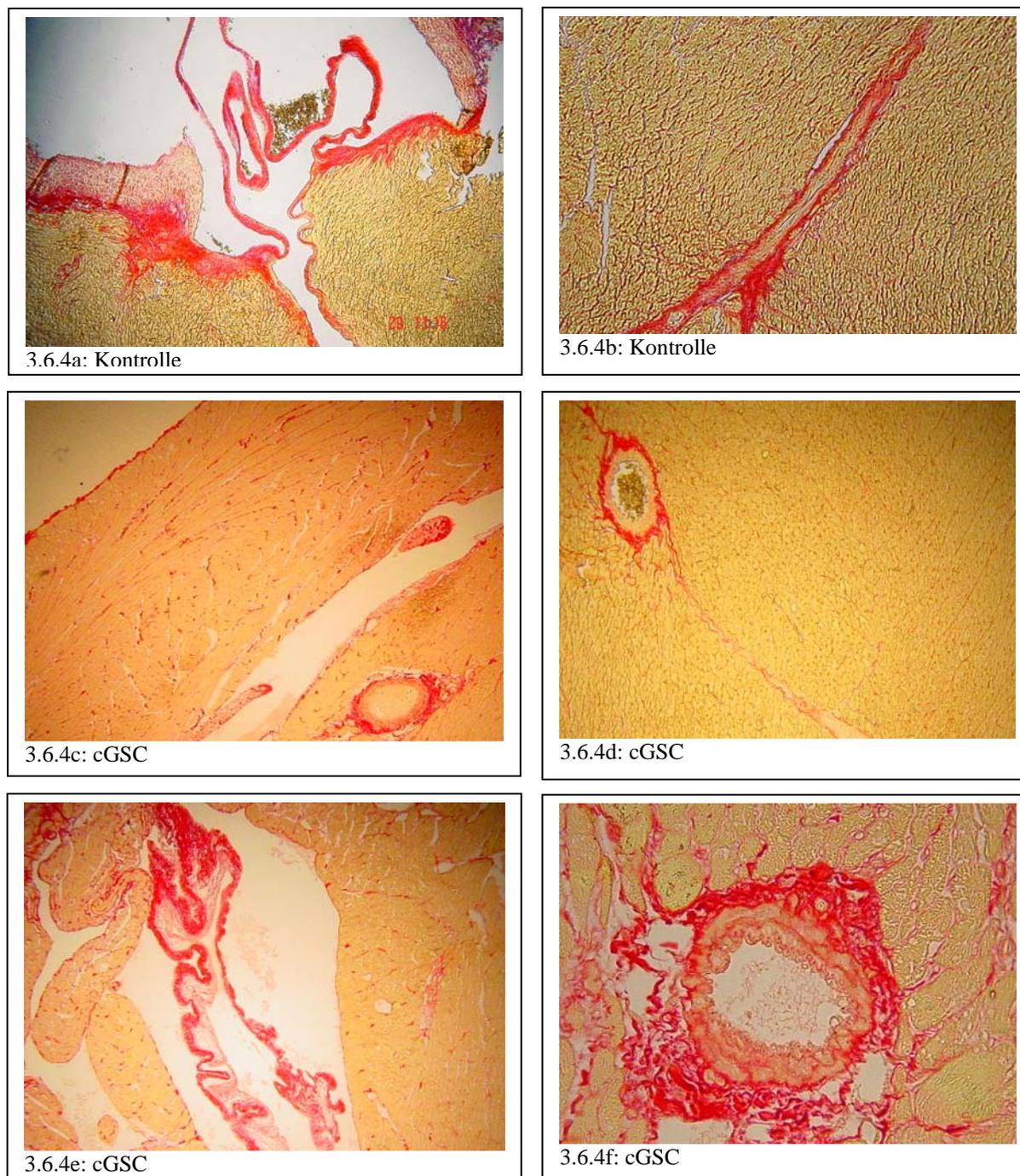


Abb. 3.6.4a – f: Sirius Red Färbungen. Sirius Red färbt bindegewebige Strukturen des Herzens rot. **Oben:** Kontrollherzen von gesunden Ratten. **Mitte & Unten:** Herzen von Ratten mit anti-THY-1-induzierter chronisch progredienter Glomerulosklerose (cGSC). Bereiche sind repräsentativ ausgewählt und dargestellt.

3.6.4a: Übersicht des Atrioventrikularbereichs mit Klappenstrukturen einer nierengesunden Ratte. **3.6.4b:** Gefäß mit Adventitia in Ventrikelgewebe.

3.6.4c: Schnitt durch re und li Ventrikel mit Endo- und Perikard; Ratte mit cGSC. **3.6.4d:** Gefäß mit Adventitia umgeben von Ventrikelmyokard.

3.6.4e: li Ventrikellumen mit Klappenapparat umgeben von Ventrikelgewebe. **3.6.4f:** Stark vergrößertes Gefäß mit Adventitia im li Ventrikel einer Ratte mit cGSC.