



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Die Charakterisierung von Proteoglykanen und Heparansulfat von
humanen glomerulären Endothelzellen und humanen
Endothelzellen der Nabelschnur und der Einfluss von Glukose auf
deren Produktion und Qualität**

Autor: Ulrich Geyer
Institut / Klinik: V. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. F. J. van der Woude

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung von biochemischen Analyseverfahren zur Untersuchung von Proteoglykanen und insbesondere von Heparansulfat. Mit diesen Verfahren sollte bei humanen Endothelzellen der Niere (HGEC) und humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) der Einfluss von Glukose auf die Produktion und Qualität von Heparansulfat untersucht werden.

Dafür wurden humane glomeruläre Endothelzellen und Endothelzellen der Nabelschnur isoliert und in einem Medium mit entweder 5,5 mM D-Glukose, 25 mM L-Glukose oder 25 mM D-Glukose für drei Tage kultiviert und mit ³⁵S-Sulfat und ³H-Glukosamin radioaktiv markiert. Nach verschiedenen Reinigungsverfahren wurde mittels HPLC und Sephadex G 50 und G 25 eine Analyse der Proteoglykane vorgenommen.

Zur Quantifizierung der De Novo Synthese der Proteoglykane führten wir bei 8 verschiedenen Zellreihen von HUVEC eine metabolische Markierung mit ³⁵S-Sulfat und ³H-Glukosamin durch. Nach dreitägiger Inkubation mit den verschiedenen Glukosekonzentrationen wurde die Aktivität im Überstand und Zellextrakt bestimmt. Als weiteres Verfahren der Quantifizierung führten wir eine Anfärbung mit einem für die Seitenketten des Heparansulfats spezifischen Antikörper (JM 403) durch, den wir mittels Immunfluoreszenz visualisierten und verglichen die Intensität der Anfärbung unter den verschiedenen Glukosekonzentrationen. Für die Untersuchung auf m-RNA Ebene vollzogen wir eine PCR der N-Deacetylase/N-Sulfotransferase.

Es gelang die Kultivierung von HGEC und HUVEC mit einem Reinheitsgrad von 90%. Mit Hilfe der DEAE - Anionenaustausch-Chromatographie mittels der HPLC konnte bei HUVEC und HGEC eine Reinigung und Trennung der Proteoglykane in zwei verschiedene Peaks vorgenommen werden. Das HPLC-Profil unterschied sich zwischen HUVEC und HGEC nicht. In der Charakterisierung der einzelnen Peaks mittels der Sephadex G 50 Säule nach der Behandlung entweder mit HNO₂, Chondroitinase ABC oder Chondroitinase AC konnte der Peak I als Heparansulfat und der Peak II als Chondroitinsulfat identifiziert werden. Damit gelang der biochemische Nachweis, dass HGEC und HUVEC Heparansulfat und Chondroitinsulfat produzieren. Die Inkubation mit 25 mM D-Glukose oder mit 25 mM L-Glukose bewirkte keine Änderung der Zusammensetzung der einzelnen Peaks. Auch kam es zu keiner signifikanten Änderung des Verhältnisses von Peak I zu Peak II.

Mit Hilfe der Sephadex G 25 Säule wurde bei HUVEC eine Analyse des Sulfatierungsmusters des Heparansulfats durchgeführt. Auch hier zeigte sich unter dem Einfluss von Glukose keine Veränderung.

Bei den Inkorporationsversuchen konnten wir keine signifikante Reduzierung zwischen der Inkubation von 25 mM D-Glukose im Vergleich zu 25 mM L-Glukose als osmotische Kontrolle nachweisen, was den rein biochemischen Effekt unabhängig von der osmotischen Wirkung erfasst. Wir konnten lediglich eine signifikante Reduzierung der ³⁵S-Sulfat und ³H-Glukosamin-Inkorporation im Überstand und von ³⁵S-Sulfat im Zellextrakt nachweisen.

Bei der Anfärbung von HUVEC mit dem Antikörper JM 403 zeigte sich keine Änderung der Stärke der Immunfluoreszenz.

Zur Untersuchung auf m-RNA Ebene vollzogen wir eine semiquantitative PCR der N-Deacetylase/N-Sulfotransferase. Auch hier zeigte sich keine veränderte Produktion der Genprodukte bei der Inkubation mit hoher Glukose. Mit dieser Arbeit gelang die Etablierung von Analyseverfahren, mit deren Hilfe die Proteoglykane Heparansulfat und Chondroitinsulfat als die Proteoglykane von HUVEC und HGEC identifiziert werden konnten. Unter der Inkubation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen ließen sich keine qualitativen wie auch quantitativen biochemischen Änderungen beobachten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es bei einer erhöhten Glukosekonzentration wie z. B. bei einem diabetischen Milieu entweder keinen Einfluss auf die Produktion von Heparansulfat gibt, oder sich die Veränderung auf einer anderen als der beobachteten Ebene vollziehen, oder sich im Sinne eines vermuteten Genpolymorphismus nur bei bestimmten Individuen manifestieren, die zum jetzigen Zeitpunkt auf Zellkulturebene noch nicht zu erfassen sind.