

Jürgen Ritter

Dr. med.

Bindung von IGF-I an kultivierte humane Endothelzellen und ihre extrazelluläre Matrix

Geboren am 12. 04. 1968 in Gießen, Hessen

Reifeprüfung am 09. 06. 1987 in Gießen, Hessen

Studium der Fachrichtung Medizin vom SS 1989 bis SS 1996

Physikum am 19. 03. 1991 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 07. 05. 1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. U. Heinrich

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Gefäßendothels als selektive Barriere für IGF-I untersucht. Als Modell dienten kultivierte humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC). Diese Zellen bilden in vitro einen Monolayer und synthetisieren eine extrazelluläre Matrix, die den in vivo Bedingungen vergleichbar ist.

Zunächst wurde die Bindung von ^{125}J -IGF-I an die Zelloberfläche und separat an die sub-endotheliale Matrix charakterisiert. Es konnte die spezifische Bindung von ^{125}J -IGF-I an HUVEC Monolayer demonstriert werden. Die Bindung war zeit- und konzentrationsabhängig. Bei 22°C erreichte die ^{125}J -IGF-I-Bindung nach 4 Stunden ein Plateau, das über mehrere Stunden konstant blieb. Im Unterschied dazu wurde bei 37°C ein Maximum der Bindung bereits nach 2 Stunden erreicht und nahm anschließend wieder ab. Durch weitere Versuche konnte gezeigt werden, daß ^{125}J -IGF-I bei 22°C nur marginal, bei 37°C zum überwiegenden Teil internalisiert wird. Die Bindungskapazität für die ^{125}J -IGF-I-Bindung an HUVEC war bei 22°C und bei 37°C gleich und betrug 2-2,5 fmol/35mm Kulturschale. Somit ließ sich der Prozeß der Internalisierung durch Beeinflussung der Inkubationstemperatur steuern. Heparin und andere Glykosaminoglykane beeinflussen die Bindung von IGF-Bindungsproteinen (IGF-BP) an Zelloberflächen. Daher wurde der Einfluß von Heparin auf die IGF-I-Bindung an HUVEC und als Vergleich an kultivierte humane Fibroblasten (HFB) untersucht. Die IGF-I-Bindung an HUVEC ließ sich nicht durch Heparin beeinflussen. Im Unterschied dazu wurde die Bindung von ^{125}J -IGF-I an HFB durch Heparin reduziert und Heparin führte zu einer Freisetzung von IGF-BP-3 in den Fibroblastenkulturen. Dies deutet indirekt darauf hin, daß die IGF-I-Bindung an HUVEC nicht durch IGF-Bindungsproteine vermittelt wird.

Zur Matrixgewinnung wurden die Zellen nichtenzymatisch durch Triton-X 100 (1% v/v) und NH_3 (20 mM) entfernt. Anschließend wurden Bindungsstudien mit ^{125}J -IGF-I in Analogie zu den Experimenten an HUVEC Monolayern durchgeführt. In dieser Arbeit wird erstmals eine spezifische Bindung von IGF-I an die extrazelluläre Matrix von Endothelzellen beschrieben. Die Bindung war zeit- und konzentrationsabhängig. Zur weiteren Charakterisierung der IGF-I-Bindung an die extrazelluläre Matrix wurde zunächst der Einfluß von Proteasen untersucht. Wurde die extrazelluläre Matrix vor den Bindungsversuchen mit Proteasen (Trypsin, Collagenase, Dispase, Plasmin) inkubiert, war die spezifische Bindung von ^{125}J -IGF-I deutlich reduziert oder sogar komplett verlorengegangen. Dies deutet darauf hin, daß Proteinbestandteile der extrazellulären Matrix für die IGF-I-Bindung erforderlich sind. Die extrazelluläre Matrix ist reich an Glykosaminoglykanen. Um die Rolle dieser Substanzgruppe bei der IGF-I-Bindung an die Matrix zu untersuchen, wurden Bindungsstudien in Anwesenheit von Überschußanteilen verschiedener Glykosaminoglykane durchgeführt. Chondroitin-Sulfat, Dermatan-Sulfat und verschiedene Heparinfraktionen hatten allesamt keinen Einfluß auf die IGF-I-Bindung an die Matrix von HUVEC. Die Bindung wurde aber durch ein Milieu hoher Ionenstärke partiell inhibiert. Mittels spezifischer Antikörper gegen Matrixproteine wurde versucht, die an der Bindung beteiligten Proteine der Matrix zu charakterisieren. Antikörper gegen Collagen Typ I und Typ IV, gegen Fibronectin, Laminin und von Willebrand Faktor hatten keinen Einfluß auf die Bindung von ^{125}J -IGF-I an die subendotheliale Matrix. Anti Vitronectin Antikörper hemmen die spezifische Bindung von ^{125}J -IGF-I an die extrazelluläre Matrix konzentrationsabhängig um bis zu 30%. Dies deutet auf eine Rolle von Vitronectin bei der Matrixbindung von IGF-I hin.

Zur Untersuchung der Frage, ob IGF-I aktiv durch das Endothel transportiert und in der extrazellulären Matrix deponiert wird, wurden HUVEC Monolayer bei 22°C und 37°C parallel mit ^{125}J -IGF-I inkubiert. Anschließend wurde die zelluläre Fraktion und die Matrixfraktion separat analysiert. Bei Raumtemperatur gelangte lediglich 5% des gebundenen ^{125}J -IGF-I in die subendotheliale Matrix. Wurden die Versuche jedoch bei 37°C durchgeführt, kam es zu einem zeitabhängigen Anstieg von gebundenen ^{125}J -IGF-I in der extrazellulären Matrix, der nach 8 Stunden 50% des spezifisch gebundenen ^{125}J -IGF-I ausmachte. Die Zunahme der Matrixbindung verlief konkordant mit der Abnahme des zellgebundenen Anteils von IGF-I.

Somit ist das Gefäßendothel aktiv an dem Transport von IGF-I aus dem Gefäßlumen in den Extravasalraum beteiligt.