

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. P. C. Weber

**Untersuchungen zur Rolle von Lysophosphatidsäure als
Thrombozyten-aktivierende Substanz arteriosklerotischer
Gefäßläsionen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Frank Enno Rother
aus
Hamburg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Siess
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. K. Walli
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. M. Weis Prof. Dr. U. Hoffmann
Dekan:	Prof. Dr. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	09.03.2006

Inhaltsübersicht

1	Einleitung	5
2	Stand der Forschung	6
2.1	Biologische Effekte von Lysophosphatidsäure	6
2.2	LPA-Synthese und –Metabolismus	9
2.2.1	LPA-Synthese	9
2.2.2	Oxidiertes LDL und LPA	12
2.2.3	Bindungs- und Transportproteine von LPA	12
2.2.4	LPA-Abbau	13
2.3	LPA-Rezeptoren und LPA-Rezeptorantagonisten	14
2.3.1	LPA-Rezeptoren	14
2.3.2	LPA-Rezeptor-Antagonisten	16
2.4	Plaquentstehung und Plaqueruptur	17
2.4.1	Entwicklung atherosklerotischer Läsionen	17
2.4.2	Plaqueruptur und Freisetzung von Thrombozyten-aktivierenden Substanzen	20
2.5	Mechanismen der Thrombozytenaktivierung	21
2.5.1	Adhäsion	24
2.5.2	Aktivierung und Gestaltwandel	24
2.5.3	Aggregation	25
3	Fragestellung der Arbeit	25
4	Material und Methoden	26
4.1	Material	26
4.1.1	Substanzen	26
4.1.2	Puffer und Lösungen	29
4.1.3	Lipidpräparationen	30
4.2	Methoden	31
4.2.1	Plauegewinnung durch TEA und weitere Präparation	31
4.2.2	Lipidisolierung und Extraktion von LPA	32
4.2.3	Lipiddifferenzierung mittels Dünnschichtchromatographie	34

4.2.4	Lipidanalyse mittels ESI-LC-MS	35
4.2.5	Präparation von LDL (<i>low-density lipoprotein</i>)	36
4.2.6	Präparation humaner Thrombozyten	36
4.2.7	Turbidometrische Messung von Gestaltwandel und Aggregation	39
4.2.8	Messung der Thrombozytenaggregation in Vollblut	40
4.2.9	Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels Fluorometrie	41
4.2.10	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des thrombozytären Aktin-Zytoskeletts	45
4.2.11	Patientenauswahl	46
4.2.12	Statistische Auswertung	47
5	Ergebnisse	48
5.1.	Untersuchungen zu synthetischen PA- und LPA- Analoga und ihre Hemmwirkung auf die LPA-induzierte Thrombozytenaktivierung	48
5.1.1	DGPP (8:0) hat keine agonistischen Effekte und hemmt spezifisch den LPA induzierten <i>shape change</i> von Blutplättchen	48
5.1.2	DGPP (8:0) hemmt die thrombozytäre Ca ²⁺ -Mobilisierung durch LPA	53
5.1.3	DGPP (8:0) hemmt die LPA-induzierte Aggregation von Blutplättchen	54
5.2.	Untersuchungen zur Bedeutung von LPA bei der Thrombozyten-Aktivierung durch Plaquematerial	55
5.2.1	DGPP (8:0) hemmt den <i>shape change</i> , induziert durch mox-LDL und den Lipidkern (<i>lipid-rich core</i>) atherosklerotischer Plaques	55
5.2.2	Quantitative LC-MS Analyse und Vergleich der biologischen Aktivität der molekularen LPA-Spezies in atherosklerotischen Läsionen	59
5.2.3	Synergistische Induktion von Thrombozytenaggregation durch LPA und den Lipidkern atherosklerotischer Läsionen mit unterschwelligen Konzentrationen von ADP und Adrenalin: Hemmung durch DGPP (8:0)	64

5.3	Untersuchungen zur klinischen Bedeutung von LPA bei Patienten mit hochgradiger Carotisstenose	67
5.3.1	Homogenate der Region Plaque-Kern induzieren nicht nur Gestaltwandel sondern eine Thrombozytenaggregation	67
5.3.2	Die gemessene Aggregation durch Homogenate der Region Plaque-Kern korreliert nicht mit dessen LPA-Gehalt	69
5.3.3	Untersuchung der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation: ADP-Rezeptorantagonisten, ASS, Tyrosinkinasehemmer, DGPP (8:0)	70
5.3.4	Der LPA-Gehalt von arteriosklerotischen Plaques ist bei Patienten mit bekannter Hypercholesterinämie signifikant höher als bei Patienten ohne Hypercholesterinämie	73
5.3.5	Thrombozyten von Patienten mit Carotisstenose reagieren auf LPA empfindlicher als Thrombozyten von gesunden Probanden	75
6	Diskussion	77
6.1	Die thrombozytären LPA-Rezeptoren	77
6.2	Identifikation von LPA-Spezies mit hoher Thrombozyten-aktivierender Potenz in den Lipidkernen atherosklerotischer Plaques	81
6.3	Der Lipidkern atherosklerotischer Plaques induziert thrombozytären Gestaltwandel und triggert die Plättchenaggregation über die Aktivierung von LPA-Rezeptoren	84
6.4	Plättchenaggregation durch Homogenate von humanen Atherosklerose-Plaques	86
6.5	Hinweise auf die klinische Bedeutung von LPA und Ausblick in die Zukunft	89
7	Zusammenfassung	91
8	Abkürzungsverzeichnis	92
9	Literaturverzeichnis	94

1 Einleitung

In den westlichen Ländern sind etwa 50 Prozent aller Todesursachen das Ergebnis von Komplikationen der Atherosklerose. In Deutschland sterben jährlich 800.000 Menschen, die Hälfte davon an kardiovaskulären Erkrankungen. Das sind mehr als doppelt so viele Menschen, wie an allen Krebsarten zusammen pro Jahr sterben⁹⁴. Die WHO definiert die Atherosklerose als eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, die aus einer fokalen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrinösem Gewebe und Kalkablagerungen besteht und mit Mediaveränderungen einhergeht¹. Atherosklerotische Läsionen entwickeln sich über Jahrzehnte unter dem Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Atherosklerose kann sich als Angina pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall, abdominelles Aneurysma oder periphere arterielle Verschlusskrankheit zeigen. Trotz dieses breiten Spektrums klinischer Erkrankungen liegt der akuten Manifestation der Atherosklerose eine gemeinsame pathogenetische Ursache zugrunde, die plötzliche Ruptur eines atherosklerotischen Plaques¹⁷⁷. Hierbei kommt es zur Freilegung von Substanzen, die Thrombozyten und Gerinnung aktivieren und dadurch zur intraarteriellen Thrombusbildung.

Lysophosphatidsäure (LPA, 1-Acyl-sn-Glycerol-3-Phosphat) ist ein potentes Phospholipid, dessen vielfältige physiologische und pathophysiologische Wirkungen vor allem in den letzten Jahren in zunehmendem Umfang entdeckt und beschrieben wurden. Inzwischen gibt es zahlreiche Hinweise, dass LPA bei der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt¹⁵⁰. LPA aktiviert viele bei der Entstehung der Atherosklerose beteiligte Zellen, z.B. Thrombozyten und Endothelzellen. Es entsteht bei der milden Oxidation von *low density lipoprotein* (LDL) und akkumuliert in atherosklerotischen Läsionen¹⁵³.

Wie aktiviert ein rupturierter Plaque die Blutplättchen und was kann getan werden, um die Gefahr der folgenden Thrombose zu verhindern? Die vorliegende Arbeit beschreibt neue Antworten auf diese vitale Frage, vor allem bezüglich der Rolle von LPA. Die pathophysiologische Bedeutung dieser Substanz in atherosklerotischen Läsionen, vor allem bezüglich ihrer Rolle bei der Plaque-induzierten Plättchenaktivierung, sowie die Pharmakologie der thrombozytären LPA-Rezeptoren werden näher beschrieben.

2 Stand der Forschung

2.1 Biologische Effekte von Lysophosphatidsäure

Seit ihrer Entdeckung durch Vogt 1957^{181,182} hat Lysophosphatidsäure (LPA) aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Effekte das Interesse der Forschung geweckt. Mittlerweile gibt es mehrere hundert Publikationen zu den physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen von LPA¹⁶⁶. LPA ist ein relativ simples Phospholipid. Es besteht aus einer Fettsäure, einem Glycerin-Grundgerüst und einer freien Phosphatgruppe. LPA ist im Gegensatz zu den meisten anderen Phospholipiden wasserlöslich (vgl. Abb. 2-1).

LPA ist seit langem bekannt als ein Zwischenprodukt des intrazellulären Fettstoffwechsels während der *de novo* Synthese von Glycerophospholipiden¹⁷⁶, die einen wesentlichen Bestandteil zellulärer Membranen darstellen. Erste Hinweise, dass LPA auch ein wichtiges biologisch aktives Lipid ist, fanden sich schon vor über 40 Jahren, z.B. die Fähigkeit glatte Muskelzellen zu kontrahieren¹⁸¹, den Blutdruck zu erhöhen¹⁶⁸ und die Thrombozytenaggregation zu stimulieren¹⁴⁷. In den letzten Jahren wurden zahlreiche weitere Wirkungen entdeckt. So ist LPA außerdem eine wichtige Zellproliferation-stimulierende Substanz im Serum und ein Entzündungsmediator¹⁰⁸. LPA bindet an spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren und stimuliert verschiedenste Wege der Signaltransduktion. Tatsächlich ist die Liste zellulärer Antworten auf LPA entsprechend umfangreich. LPA kann sowohl schnelle Effekte, wie zellulären Gestaltwandel und Migration von Zellen durch dynamische Veränderungen des Zytoskeletts, als auch lang anhaltende Antworten durch die vermehrte Expression bestimmter Gene hervorrufen. Durch letzteres können Zellproliferation stimuliert sowie die Apoptose gehemmt werden. LPA wird deshalb eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und -wachstum zugesprochen¹⁰⁸.

Auch auf die Zellen der Gefäßwand und die Blutzellen hat LPA zahlreiche Wirkungen. Eine Übersicht gibt Tabelle 2-1.

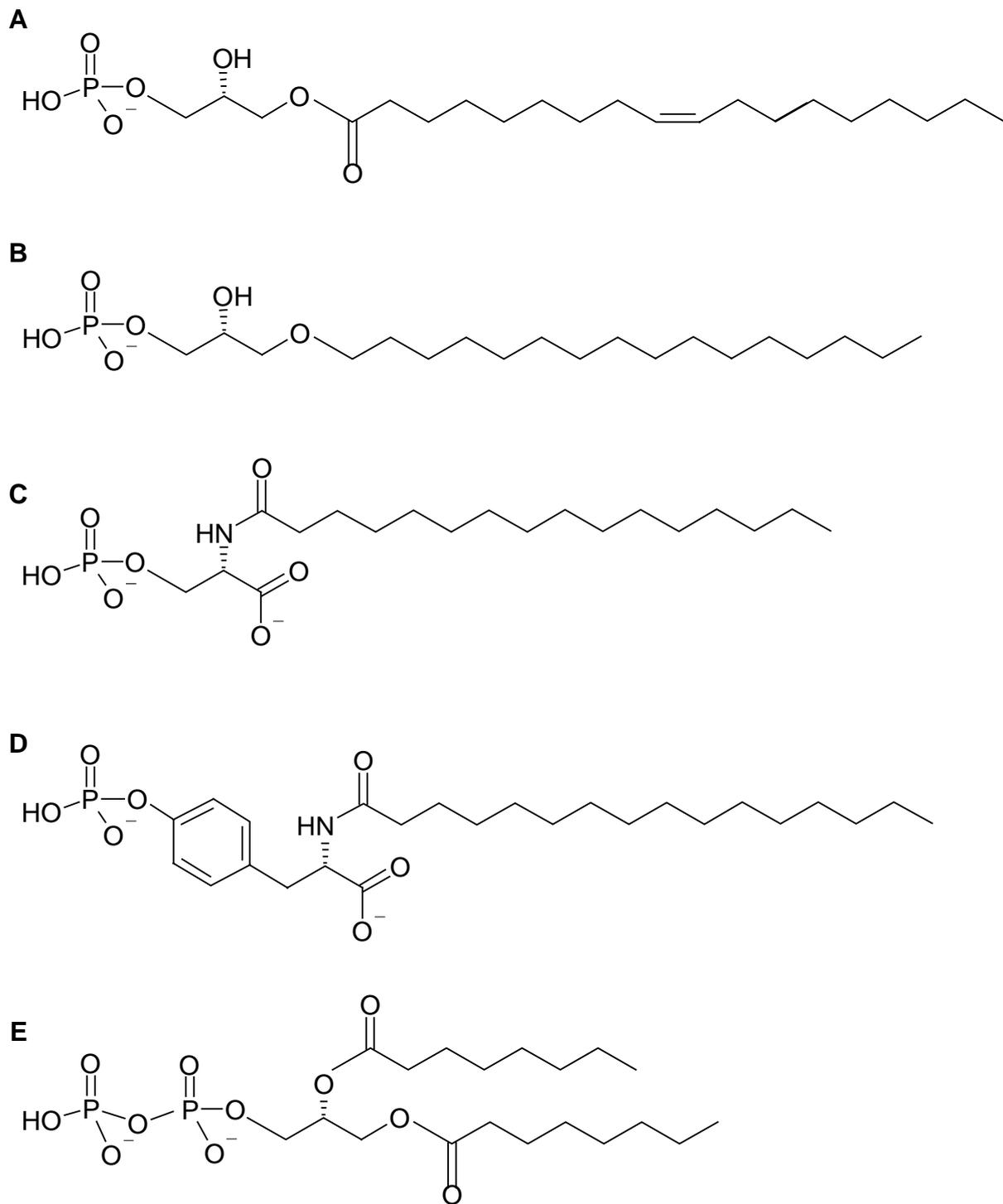


Abbildung 2-1: Strukturformeln von LPA und LPA-Antagonisten. (A) Oleoyl-Lysophosphatidsäure oder acyl-LPA (18:1), (B) Mono-(16:0)-Alkyl-Glycerol-Phosphat oder alkyl-LPA (16:0), (C) N-Palmitoyl-Serin-Phosphorsäure, (D) N-Palmitoyl-Tyrosin-Phosphorsäure und (E) 8:0-Diacyl-Glycerol-Pyrophosphat (DGPP 8:0).

Tabelle 2-1:*Endothelzellen*

Kontraktion, Durchlässigkeit	++ oder -
Proliferation	++
Chemotaxis, Migration	+

Glatte Muskelzellen

Kontraktion	++
Proliferation	++
Chemotaxis, Migration	+

Fibroblasten

Kontraktion	++
Proliferation	++

Makrophagen

Protektion vor Apoptose	++
-------------------------	----

T-Lymphozyten

Migration	++ oder --
IL-2 Sekretion	++ oder --
Protektion vor Apoptose	++
Proliferation	+

Thrombozyten

Gestaltwandel (<i>shape change</i>)	++
Aggregation	+

Tabelle 2-1: Biologische Effekte von LPA auf vaskuläre Zellen und Thrombozyten. Stimulierende (+) und hemmende (-) Wirkung von LPA. Tabelle entnommen aus ¹⁵⁰.

2.2 LPA-Synthese und -Metabolismus

2.2.1 LPA-Synthese

Es gibt mehrere Wege, auf welchen unser menschlicher Körper LPA herstellen kann. Man kann hierbei zwischen den Synthesewegen des intrazellulären Fettstoffwechsels und Synthesewegen der LPA-Produktion, die v.a. nach Zellstimulation bedeutsam sind, unterscheiden¹²⁶. Einen Überblick gibt die Abbildung 2-2. Die einzelnen, nummerierten Synthesewege werden im nachfolgenden Text erläutert.

LPA ist ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Synthese von Phosphatidsäure (PA). LPA entsteht aus Glycerol-3-Phosphat (G3P) und acyl-CoA durch die Glycerophosphat-Acyltransferase (1) sowie aus Monoacylglycerol (MAG) durch die Monoacylglycerolkinase (2). Diese Schritte laufen v.a. in den Mitochondrien und Mikrosomen ab. LPA kann durch die Monoacylglycerolphosphat-Acyltransferase zu Phosphatidsäure (PA) weiterverarbeitet werden (3)^{155,178}. Aus PA werden dann weitere Phospholipide gebildet, die den Hauptbestandteil biologischer Membranen ausmachen (4). Ein alternativer Syntheseweg von LPA ist die Reduktion von Acyl-Dihydroxy-Acetonphosphat in den Peroxisomen (5), wie unter dem Einfluss hoher Glucosekonzentrationen in Pankreasinselnzellen gezeigt werden konnte⁴⁴.

Nach Zellstimulation lassen sich zwei Wege der LPA-Bildung unterscheiden, nämlich die thrombozytäre, membranassoziierte LPA-Synthese und die LPA-Synthese mittels im Plasma vorhandener Lysophospholipase D. Im Plasma ist die Konzentration von LPA mit etwa 100-500 nM relativ gering^{20,143}. Im Serum liegt die LPA-Konzentration im mikromolaren Bereich, also deutlich höher^{4,155}. Es liegt daher nahe zu vermuten, dass LPA während der Blutgerinnung freigesetzt wird.

Nach Thrombozyten-Stimulation wird rasch membranassoziierte Phosphatidsäure, durch PLC-Aktivierung und Diacylglycerokinase oder Phospholipase D-Aktivierung, gebildet (6). Dieser Vorgang dauert wenige Minuten. LPA kann aus PA durch sequentielle Entfernung des Acylrestes durch die Phospholipase A₁ (PLA₁) oder die Phospholipase A₂ (PLA₂) synthetisiert werden (7)⁸⁸. Auch aus Membranlysophospholipiden, z.B. Lysophosphatidylcholin (LPC) kann LPA durch Abspaltung des Cholinrestes mittels (membranassoziiertes) Lysophospholipase D (Lyso-PLD) entstehen (8). Diese direkte

Freisetzung von LPA aus den Thrombozyten und zu einem geringen Teil auch den Erythrozyten (14) ist für etwa 10% des LPA im Serum verantwortlich²⁰.

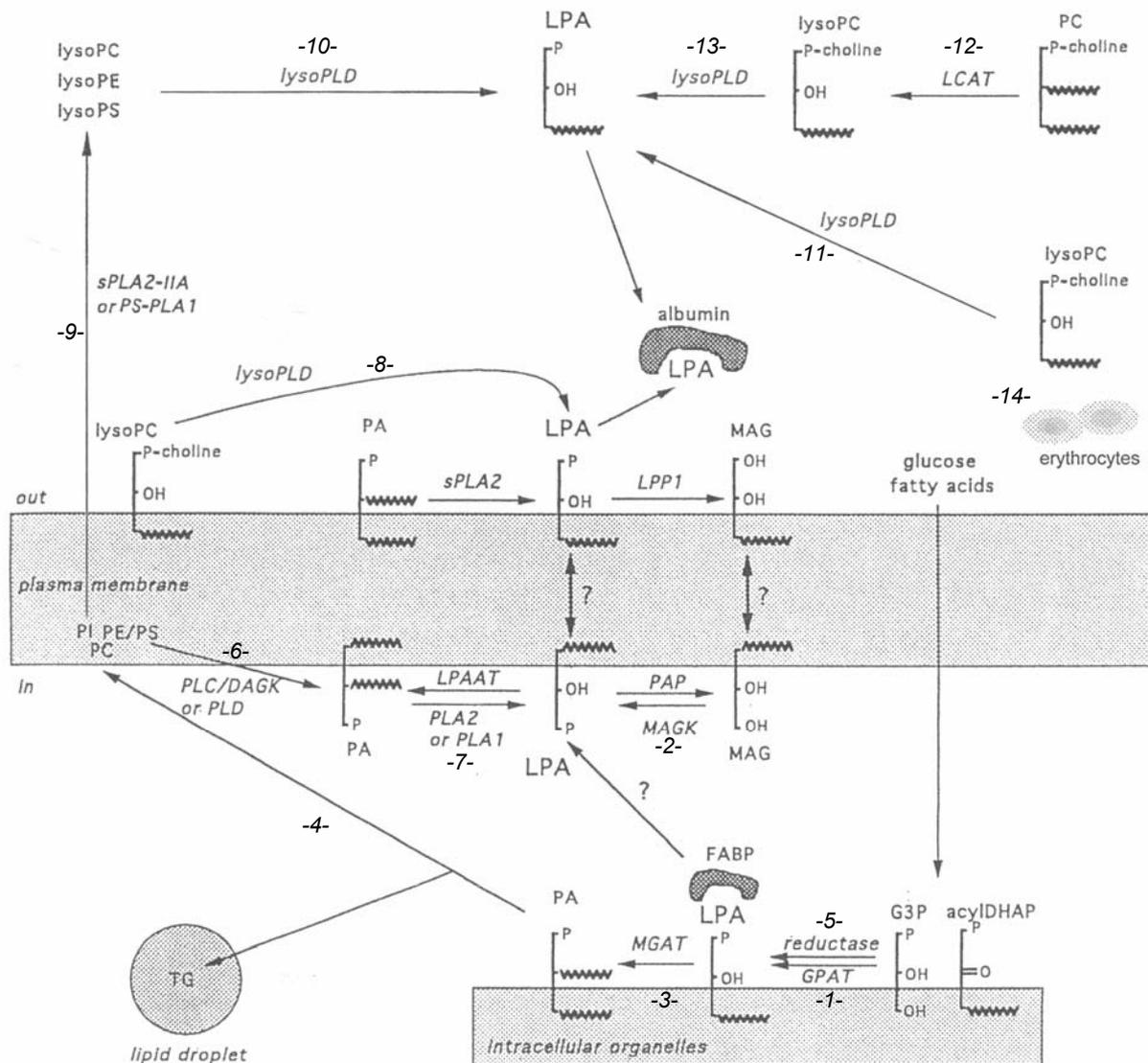


Abbildung 2-2: Die verschiedenen Synthesewege von LPA. Abbildung erstellt nach Aoki et al.¹⁰ und Pages et al.¹²⁵. Die einzelnen Syntheseschritte sind durch nummeriert und im Text beschrieben. Nr. 1-5: Wege der LPA-Synthese, die v.a. im intrazellulären Fettstoffwechsel und Phospholipidstoffwechsel von Bedeutung sind. Nr. 6-8: Wege direkten LPA-Synthese nach Zellstimulation. Nr. 9-13: Wege der LPA-Synthese, die von plasmatischer Lyso-PLD abhängig sind. Nr. 14: Freisetzung von LPA durch Erythrozyten. Abkürzungen erläutert im Text.

Die Entdeckung, dass im Serum deutlich höhere Konzentrationen an LPA und andere LPA-Spezies (v.a. mit ungesättigten Fettsäureresten) gefunden werden als nach Stimulation von

Thrombozyten in Pufferlösung, ließ einen wesentlichen Faktor der LPA-Synthese im Plasma vermuten^{112,138,155}.

In stimulierten Blutplättchen werden verschiedene PLA-Enzyme aktiviert (z.B. die sekretorische sPLA₂-IIA und die Phosphatidylserin-PLA₁), die einen neuen Pool an Lysophospholipiden synthetisierten (9). Mehrere Autoren konnten zeigen, dass Thrombin-stimulierte Plättchen auf diese Art und Weise aus Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) Lyso-PC, Lyso-PS und Lyso-PE bilden^{143,144}. Hieraus kann dann durch die plasmatische Lysophospholipase D LPA entstehen (10).

Die sekretorische PLA₂ Typ II, die auch in menschlichen Blutplättchen exprimiert ist, hat nur begrenzte Fähigkeit, Lipide in intakten Zellmembranen zu hydrolisieren. Lipide in beschädigten Zellmembranen, in Membranen aktivierter Zellen oder Mikrovesikeln sind jedoch der Hydrolyse durch sPLA₂-II gut zugänglich^{9,55,65}. Der reaktionsbestimmende Schritt scheint die Freisetzung der PLA-Enzyme zu sein. Die Aktivität der Lysophospholipase D wird nicht durch die Blutgerinnung verändert und ist im Plasma und im Serum weitestgehend identisch¹⁰. Eine weitere Synthesemöglichkeit für LPA im Serum ist schließlich die direkte Bildung aus Lyso-PC im Plasma (11), welches mit einer Konzentration von 125-150 µM das prominenteste Lysophospholipid im Plasma darstellt⁷⁹. Lyso-PC ist im Plasma hauptsächlich an Albumin gebunden und zu einem geringeren Teil Bestandteil von Lipoproteinen³³. Die Quellen von Lyso-PC sind einerseits die Leber, die es mit einer spezifischen Leber-PLA₁ bildet und andererseits die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) (12). Das Plasmaenzym LCAT spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus der Lipoproteine. Es wird durch apoA-I aktiviert und überträgt eine Fettsäure von PC auf freies Cholesterol. Auf diese Weise wird extrahepatisches freies Cholesterol von *high density lipoproteins* (HDL) aufgenommen. Aus dem entstehenden Lyso-PC wird dann wiederum mittels Lyso-PLD LPA freigesetzt (13). Tatsächlich wird im inkubierten Plasma von LCAT defizienten Patienten auch deutlich weniger LPA gebildet¹⁰.

Betrachtet man diese verschiedenen Synthesewege von LPA, wird deutlich, dass bei einem Großteil die Lyso-PLD eine wichtige Rolle spielt. Die jüngste Entdeckung, dass die Lyso-PLD identisch ist mit Autotaxin, hat zahlreiche Untersuchungen über die mögliche Rolle von LPA bei Karzinomen hervorgerufen¹⁰⁸. Autotaxin (ATX) wurde erstmals beschrieben als ein autokriner Motilitätsfaktor, der von Melanomzellen freigesetzt wird¹⁵⁸. Später fand man, dass ATX zu einer Familie von Ekto-Nukleotid-Phosphodiesterasen gehört, die Phosphodiester- und Pyrophosphatbindungen hydrolysieren, wie man sie in ATP und ADP findet¹¹⁶. Neueste

Erkenntnisse zeigen jedoch, dass ATX mit hoher Affinität Lysophospholipide hydrolysiert. ATX/LysoPLD ist ein Transmembranprotein mit einem kurzen N-terminalen Region, einer einzelnen Transmembrandomäne, zwei Cystin reichen Somatomedin B ähnlichen Domänen und einer größeren katalytischen Ektodomäne. Lösliche Formen werden durch proteolytische Spaltung freigesetzt¹¹⁶. Genauere Erkenntnisse über die Bedeutung von ATX/LysoPLD bezüglich der Thrombozytenaktivierung und der Atheroskleroseentstehung sind bislang nicht vorhanden. Wie erwähnt scheint jedoch die Aktivität von LysoPLD während der Blutgerinnung unverändert, da sowohl im Plasma als auch im Serum ähnliche LysoPLD Aktivitäten beobachtet werden.

2.2.2 Oxidiertes LDL und LPA

Bemerkenswert ist des Weiteren, dass LPA während der milden Oxidation von LDL auf eine nicht enzymatische Weise entsteht¹⁵³. Diese Tatsache lässt eine Verbindung zwischen der Bildung von LPA und den oxidativen Prozessen der Atherogenese vermuten. Oxidativ verändertes LDL (oxLDL) wird über *scavenger*-Rezeptoren von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen aufgenommen und trägt so wesentlich zur Entstehung eines Plaques bei. Tatsächlich akkumuliert auch LPA in atherosklerotischen Plaques¹⁵³. Oxidativ verändertes LDL aktiviert Thrombozyten über den höheren Gehalt an LPA¹⁵³. Die genauen Mechanismen, wie LPA in oxidativ verändertem LDL entsteht, sind unbekannt.

Vorstellbar ist die indirekte Bildung von LPA aus Phosphoglyceriden. Phosphoglyceride in LDL-Partikeln, besonders solche mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure in der *sn-2* Position, verändern ihre Struktur durch Peroxidation. Es entstehen Phosphoglyceride mit oxidativ verkürzten Fettsäureketten (Oxovaleroyl-, Glutaroyl- und Epoxyisoprostanoyl-Gruppen in der *sn-2* Position)¹¹⁷. Diese Phospholipide stimulieren inflammatorische Vorgänge, die einen wesentlichen Anteil an der Pathophysiologie der Atherosklerose haben^{95,159}. Inaktiviert werden diese Substanzen durch Abspaltung des oxidativ alterierten *sn-2* Restes mittels der *Platelet-activating factor*-Acetylhydrolase, die mit LDL assoziiert ist¹⁵⁹. Aus diesen Lysophospholipiden könnte dann durch Hydrolyse mittels (Lyso-)PLD LPA entstehen.

2.2.3 Bindungs- und Transportproteine von LPA

Im Plasma bindet das amphiphile LPA v.a. an Albumin und in geringerem Maß an Gelsolin^{67,165}. Albumin bindet LPA mit einer Affinitätskonstante K_d von 360 nM und in

einem stöchiometrischen Verhältnis von ungefähr 3 mol LPA/mol Albumin. Hierbei konkurriert LPA um die Bindungsstellen mit LPA-ähnlichen Substanzen wie Alkyl-Acetyl-PA und PAF, jedoch nicht mit LPC oder LPE, die an einer anderen Stelle binden¹⁷¹. Gelsolin ist eigentlich ein intrazelluläres Aktin-bindendes Protein, das aber auch eine sekretorische extrazelluläre Isoform hat. Bei Zellzerfall, z.B. durch Verletzung kommt es zur Freisetzung von Aktin und somit Verdrängung von LPA aus der Bindung an Gelsolin. Ein solcher Mechanismus könnte die Konzentration an freiem LPA erhöhen und die zellulären Reparaturvorgänge unterstützen⁹⁹.

Die LPA-Bindungsproteine regulieren die biologische Aktivität von LPA im Plasma. Die LPA Konzentration im Plasma beträgt etwa 100 nM. Gleichwohl sprechen die LPA Rezeptoren schon auf wenige Nanomol LPA an. Diese Diskrepanz erklärt sich u.a. durch Bindung an Plasmaproteine und entsprechende Modulation der Rezeptorverfügbarkeit von LPA^{70,171}. Intrazellulär bindet LPA an das so genannte *fatty acid binding protein*¹⁷⁹.

2.2.4 LPA-Abbau

Angesichts des breiten Wirkspektrums von LPA ist eine genaue Regulation der Aktivität und eine Begrenzung der Wirkdauer dieses Phospholipids für die Wahrung der Zellhomöostase von entscheidender Bedeutung. Drei verschiedene Möglichkeiten des LPA-Abbaus sind gegenwärtig bekannt.

Lipidphosphat Phosphohydrolasen (LPP) stellen eine Familie mit bisher vier bekannten Isoformen dar, die PA und LPA dephosphorylieren^{82,93,184}. Die einzelnen Isoformen haben jeweils unterschiedliche Affinität zu den einzelnen Phospholipiden. LPP₁ bevorzugt LPA, LPP₂ bevorzugt PA und LPP₃ hat sowohl zu LPA als auch PA eine ähnlich hohe Affinität^{136,184,184}. Die LPPs sind integrale Membranektoenzyme mit sechs Transmembrandomänen¹⁷⁵ und in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert. LPP₃ scheint ubiquitär vorzukommen, während sich LPP₁ hauptsächlich in Prostata, Herzmuskel, Blase, Uterus, Fettgewebe und nicht zuletzt auch auf Thrombozyten findet^{82,156}. Smyth et al. konnten vor kurzem zeigen, dass LPP₁ auf humanen Thrombozyten wesentlich an der Regulation der LPA Produktion und der weiteren Signalverarbeitung beteiligt ist. Nach Stimulation wird intrazelluläres membrangebundenes LPP₁ an der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Hier sorgt LPP₁ einerseits für den LPA-Abbau durch Dephosphorylierung und reguliert LPP₁ andererseits wohl den lokalen Pool an LPA, der dann die LPA Rezeptoren aktivieren kann¹⁵⁶. Diese Idee des "restricted access" wurde auch schon von Xu et al. für den

LPA₁ Rezeptor vermutet¹⁹¹. Hemmt man LPP₁ so kommt es zu einer verstärkten Aggregation der Thrombozyten nach LPA Stimulation¹⁵⁶. Wie allerdings eine solche Interaktion zwischen LPA-Rezeptor und LPP₁ explizit funktioniert ist bisher unklar.

Die LPA-Acetyltransferase (LPAAT), vorhanden in Mikrosomen und der Plasmamembranfraktion, spielt sowohl bei der *de novo*-Synthese von Glycerolipiden wie auch beim Umbau von Membranphospholipiden eine wichtige Rolle und wandelt, durch Übertragung einer Acyl-Gruppe auf die *sn2*-Position, LPA zu Phosphatidsäure um¹⁴⁶. Mutationen im LPAATβ-Enzym sind für die progressive Lipodystrophie, auch bekannt als Berardinelli-Seip-Syndrom, verantwortlich⁵.

Als dritte Möglichkeit der LPA-Inaktivierung sind Lysophospholipasen anzusehen, welche durch Abspaltung der Acyl-Gruppe LPA zu Glycerol-3-Phosphat abbauen. Bereits 1994 wurde eine derartige Lysophospholipase aus dem Gehirn von Ratten isoliert¹⁶⁴.

2.3 LPA-Rezeptoren und LPA-Rezeptorantagonisten

2.3.1 LPA-Rezeptoren

Bislang sind vier Membranrezeptoren für LPA bekannt. Der LPA₁-, LPA₂- und LPA₃-Rezeptor wurde 1996, 1998 bzw. 1999 kloniert^{8,15,74}. Sie gehören zur so genannten "endothelial differentiation gene" (EDG) Familie G-Protein gekoppelter Rezeptoren und wurden früher als EDG-2, EDG-4 und EDG-7 Rezeptor bezeichnet²⁹. Fünf weitere EDG Rezeptoren binden das bioaktive Phospholipid Sphingosin-1-Phosphat. Der Ligandenspezifität und dem Zeitpunkt der Erstbeschreibung folgend werden die Rezeptoren gemäß der neuen Nomenklatur als LPA₁ bis LPA₄ und S1P₁ bis S1P₅ benannt¹⁰¹. Die LPA Rezeptoren bestehen aus jeweils sieben transmembranösen Domänen, die am N-terminalen Ende glykolysiert sind, Schwefel-Brückenbindungen zwischen den extrazellulären Windungen tragen und im intrazellulären Anteil Phosphorylierungsstellen besitzen⁸. In den LPA-Rezeptoren LPA₁₋₃ finden sich konkordant im Bereich der Liganden-Bindungsstelle kationische Reste der dritten und siebten Transmembrandomäne, die mit der polaren Kopfgruppe von LPA interagieren¹⁸⁵.

Kürzlich wurde ein vierter LPA-Rezeptor (LPA₄) beschrieben, der kaum Ähnlichkeit mit den anderen LPA-Rezeptoren aufweist. LPA₄ ist eher verwandt mit purinergen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (P2Y), obwohl er keine Nucleotide bindet¹²¹. Ebenso hat der LPA₄-

Rezeptor Sequenzhomologien mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor für *platelet activating factor (PAF)*. Der Rezeptor koppelt mit G_s und fraglich mit G_i verbunden¹²¹. Die biologische bzw. pathophysiologische Bedeutung des LPA₄-Rezeptors ist noch unbekannt.

Die LPA Rezeptoren sind weit verbreitet, besonders LPA₁ und LPA₂ sind in den meisten Geweben exprimiert⁸⁰. *Knock-out* Mäuse, denen der LPA₁-Rezeptor fehlt zeigen ein gestörtes Trinkverhalten, wohl durch Störung des olfaktorischen Systems. Die Hälfte der LPA₁-*knock out* Mäuse stirbt daher postnatal und die Überlebenden zeigen ein vermindertes Wachstum. Das Fehlen des LPA₂ Rezeptor Genes verursachte keinerlei phänotypischen Auffälligkeiten. Die Kombination aus LPA₁- und LPA₂-Rezeptor *knock-out* verursacht neben den genannten Auffälligkeiten der LPA₁-Rezeptor Deletion lediglich vermehrte frontale Hämatome³⁰. Mäuse, welchen der LPA₃- oder LPA₄-Rezeptor fehlt, sind bisher nicht beschrieben. Auf humanen Thrombozyten wurden indirekt mittels RT-PCR die LPA-Rezeptoren LPA₁, LPA₂ und LPA₃ nachgewiesen¹¹².

Die Fülle der zellulären und biologischen Effekte von LPA erklärt sich durch die Koppelung der LPA Rezeptoren an mindestens drei verschiedene G-Proteine (G_q , G_i , $G_{12/13}$), welche auf verschiedene Effektorsysteme einwirken¹⁰⁸. Aktivierung von G_q bewirkt, vermittelt über die Phospholipase C und Hydrolyse von Phosphatidylinositbiphosphat, eine durch Diglycerid verursachte Stimulierung der Protein Kinase C und durch Inosit-1,4,5-trisphosphat eine Erhöhung des intrazellulären Calciums¹⁰⁹. Durch die Aktivierung von G_i werden konsekutiv Tyrosinkinasen, Ras und MAP Kinasen aktiviert, die das Zellwachstum und die Zellproliferation stimulieren. Die Aktivierung des heterotrimeren G-Protein $G_{12/G13}$ bewirkt v.a. die Stimulation des kleinen GTP-bindenden Proteins Rho und der Rho-Kinase und die dadurch vermittelte Bildung von Aktin-Stress-Filamenten sowie Zellkontraktion¹⁵⁰.

McIntyre et al. konnten 2003 zeigen, dass LPA außer an die membranständigen LPA-Rezeptoren auch an den intrazellulären Rezeptor *peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)* bindet¹⁰⁶. PPAR-Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren mit drei bekannten Isoformen: PPAR α , PPAR β und PPAR γ . PPARs können durch eine große Zahl an Lipiden (oxidierte Fettsäuren, Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α und Interferon- γ) aktiviert werden¹³⁸, u.a. bindet an PPAR γ auch an das orale Antidiabetikum Rosiglitazone. PPAR-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle beim Energiestoffwechsel und Lipidmetabolismus der Zelle. Neue Studien zeigen auch eine Bedeutung bei inflammatorischen Vorgängen, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose^{32,41,47}. Ligandenbindung an diese Rezeptoren führt zur Aktivierung und Heterodimerisierung mit dem Retinolsäure X-Rezeptor.

Diese Heterodimere koppeln dann im Nucleus an spezifische *peroxisome proliferator response elements* und aktivieren so die Transkription bestimmter Gene¹⁷⁴. So bewirkt die PPAR γ -Aktivierung, die Stimulation der Expression des CD36-Rezeptors, der als *scavenger receptor* die Aufnahme von oxidierten LDL-Partikeln in Makrophagen bewirkt¹⁰⁰. PPAR γ wird in Monozyten/Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen exprimiert. Besonders hohe Konzentrationen findet man in atherosklerotischen Läsionen und in der hypertensiv veränderten Gefäßwand^{41,95}. Die Gruppe von G. Tigyi et al. konnten in einer aktuellen Studie zeigen, dass LPA über die Aktivierung von PPAR γ die Neointima-Bildung in Ratten induziert¹⁹⁴.

2.3.2 LPA-Rezeptor-Antagonisten

Spezifische LPA-Rezeptor-Antagonisten sind ein wichtiges Werkzeug um die vielfältigen physiologischen bzw. pathophysiologischen Effekte von LPA besser zu verstehen.

Dioctylglycero-Pyrophosphat (DGPP 8:0, siehe Abb. 2-1) und Dioctylphosphatidsäure (PA 8:0) wurden von Fischer et al. als spezifische Antagonisten des LPA₁- und LPA₃-Rezeptors, nicht jedoch des LPA₂-Rezeptors, beschrieben⁵³. Diese Phospholipide kommen in Pflanzen, Bakterien und Hefe vor, ersteres jedoch nicht in Säugetierzellen. DGPP wurde 1993 erstmals als ein neues Lipid in Pflanzen entdeckt und entsteht durch Phosphorylierung von Phosphatidsäure durch Phosphatidat Kinase^{114,188}. Agonistische Effekte für DGPP (8:0) wurden in Säugetierzellen bisher nicht beobachtet⁵³. DGPP (18:1) induzierte allerdings in hoher mikromolarer Konzentration oszillierende Chloridströme an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.

N-Acyl-Tyrosin-Phosphorsäure (NATyrPA) und *N*-Acyl-Serin-Phosphorsäure (NASerPA) sind LPA ähnliche Moleküle (siehe Abb. 2-1). Für beide Substanzen wurden hemmende Effekte auf verschiedene LPA-induzierte Wirkungen (thrombozytärer Gestaltwandel und Thrombozytenaggregation, Ca²⁺-abhängigen Einstrom von Chloridionen in neutrophilen Zellen und Expression von Adhäsionsrezeptoren auf Endothelzellen) gefunden^{78,97,135,160}. LPA-antagonistische Wirkungen wurden ferner für Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* sowie für humane Endothelzellen beschrieben^{19,135,153}. Gleichwohl haben beide Substanzen u.a. auf die Thrombozytenaktivierung agonistische Wirkungen⁶⁹. Ein Teil ihrer antagonistischen Wirkungen lässt sich somit auch durch Rezeptor-Desensitisierung erklären. Unter Desensitisierung versteht man die „Abschwächung der biologischen Antwort während andauernder (oder erneuter, *Anmerkung des Verfassers*) Exposition mit einem Stimulus“^{24,96}.

Ausgehend von biomathematischen Analysen mittels Rezeptormodellierung wurden jüngstens verschiedene Phosphorsäuremonoalkylester, sog. *fatty alcohol phosphates (FAP)* als spezifische Agonisten des LPA₁ und spezifische Antagonisten des LPA₁ und LPA₃ Rezeptors¹⁸⁰ gefunden.

2.4 Plaquentstehung und Plaqueruptur

2.4.1 Entwicklung atherosklerotischer Läsionen

Atherosklerose entwickelt sich unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren, insbesondere hohem LDL-Cholesterin, arterieller Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Alter, Geschlecht und genetischer Disposition. Pathogenetisch liegen der Atherosklerose komplexe inflammatorische Vorgänge zugrunde.

Die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beginnt mit der Ansammlung von LDL-Cholesterin im subendothelialen, extrazellulären Raum der Arterienwand. Hierbei spielt die endotheliale Dysfunktion eine wichtige Rolle²⁸. Das Endothel bildet die Innenauskleidung der Blutgefäße und stellt eine semipermeable Membran für Makromoleküle und eine gerinnungsneutrale Oberfläche dar. Wird das Endothel durch kardiovaskuläre Risikofaktoren geschädigt, ändert sich die Durchlässigkeit des Endothels für Lipoproteine. Des Weiteren wird die Produktion vasodilatierender Substanzen vermindert, die Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten und Monozyten erhöht und schließlich ein lokales Ungleichgewicht pro- und antithrombotischer Faktoren sowie von Wachstum stimulierenden bzw. hemmenden Stoffen hervorgerufen⁴⁰. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass LPA und milde oxidiertes LDL eine Kontraktion von Endothelzellen und interzelluläre Spaltenbildung hervorrufen kann^{34,48,76,120,153,183} und somit die Permeabilität des Endothels für LDL erhöht. In zwei Studien konnten jedoch auch stabilisierende Effekte von LPA auf die Integrität der Endothelzellschicht nachgewiesen werden^{7,46}. Diese widersprüchlichen Daten erklären sich möglicherweise durch unterschiedliche LPA-Rezeptorexpression, verschiedene Zellkulturbedingungen oder unterschiedliche Endothelzellen¹⁵⁰. Auch bezüglich der Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten und Monozyten hat LPA eine induzierende Wirkung. Rizza et al. konnten nachweisen, dass LPA die Expression des *vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1)* sowie von *E-selectin* erhöht und die Bindung von Monozyten stimuliert¹³⁵. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass LPA den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert und hierdurch zahlreiche proinflammatorische Substanzen und Adhäsionsmoleküle gebildet werden, u.a. das *monocyte chemoattractant*

protein-1 (MCP-1)¹²⁶ und das *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1⁹⁰). Die Expression solcher Adhäsionsmoleküle führt zu einem Anlocken von Monozyten an das veränderte Endothel und somit zur Einleitung inflammatorischer Vorgänge¹⁰⁵.

Das im Rahmen der endothelialen Dysfunktion akkumulierte LDL wird durch lokale vaskuläre Zellen, d.h. Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen zum so genannten minimal modifizierten LDL (mm-LDL) milde oxidiert. Dies führt über die Endothelaktivierung zur Stimulation der Monozytenadhäsion.³⁹ Makrophagen in der Intima verursachen eine weitere Oxidation des mm-LDL zu ox-LDL, das dann von den Makrophagen aufgenommen wird. Zwei *scavenger*-Rezeptoren für ox-LDL scheinen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen, SR-A und CD36^{52,161}. Dieser Prozess unterliegt keiner negativen Rückkopplung, was zu einer ungehemmten Aufnahme von ox-LDL führt. Durch die Akkumulation von LDL-Partikeln entstehen Schaumzellen, besonders fettreiche Makrophagen, die typisch für die atherosklerotische Läsion sind. Die entsprechende initiale Veränderung der Gefäßwand bezeichnet man als *fatty streak*¹³⁹.

Durch Ansammlung und Absterben solcher Schaumzellen, die aus Makrophagen und auch aus T-Lymphozyten entstehen, kommt es zu Lipidakkumulation und schließlich zur Entwicklung des atherosklerotischen Plaques¹³⁹. Ein weiterer wichtiger Vorgang hierbei sind Veränderungen glatter Muskelzellen (VSMC, *vascular smooth muscle cells*) der Media, die sich durch inflammatorische Stimuli dedifferenzieren, in die Intima einwandern und proliferieren. Dieser Prozess wird als Neointima-Bildung bezeichnet und führt zur Progression der atherosklerotischen Läsion. LPA stimuliert die Proliferation von VSMC und Fibroblasten^{63,169} sowie die Dedifferenzierung von VSMC⁷³. Letzteres wurde interessanterweise nur durch ungesättigte LPA-Spezies hervorgerufen. Die Erklärung hierfür kam mit der Entdeckung des intrazellulären LPA-Rezeptors PPAR γ , der nur durch ungesättigte LPA-Spezies aktiviert wird. Tatsächlich konnte Yoshida et al. die Induktion der Neointima-Bildung durch LPA am Tiermodell¹⁹³ und Zhang et al. die Verknüpfung mit dem PPAR γ -Rezeptor nachweisen^{194,195}.

Ein wichtiges Merkmal des atherosklerotischen Plaques ist die Stabilität der bindegewebigen Kappe, die den stark thrombogenen lipidreichen Kern, das Atherom, von den zirkulierenden Blutplättchen und anderen Gerinnungsfaktoren trennt¹⁸⁷. Stabile atherosklerotische Plaques sind gekennzeichnet durch einen verhältnismäßig kleinen lipidreichen Kern, der durch eine

kräftige bindegewebige Kappe mit zahlreichen glatten Muskelzellen geschützt wird. Diese Kappe kann durch LDL-Senkung deutlich stabilisiert werden¹⁸⁷.

Studien konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines akuten koronaren Ereignisses stärker mit der Vulnerabilität eines Plaques als mit dem eigentlichen Stenosegrad korreliert¹⁰⁰. Vulnerable Plaques sind lipidreich, haben eine dünne bindegewebige Kappe und einen hohen Anteil inflammatorischer Zellen. Die Integrität der bindegewebigen Kappe wird durch diese Entzündungszellen wesentlich beeinflusst. T-Zellen produzieren z.B. INF- γ , das die Produktion von extrazellulärer Matrix durch glatte Muskelzellen vermindert. Solche infiltrierenden T-Zellen sind besonders an rupturgefährdeten oder schon thrombosierten Stellen zu finden⁹⁴. LPA hat auf T-Zellen proinflammatorische Einflüsse, jedoch abhängig von der Expression der einzelnen LPA-Rezeptoren. Bei hoher Expression des LPA₁-Rezeptors humaner CD4⁺ Zellen stimuliert LPA die IL-2 Sekretion, bei überwiegender Expression des LPA₂-Rezeptors hemmt LPA die IL-2 Sekretion^{67,196}. Zusätzlich gibt es Hinweise aus Experimenten mit humanen T-Lymphoblastom Zelllinien, dass LPA die Apoptose von T-Zellen hemmt⁶⁶. Destabilisiert wird der Plaque des Weiteren durch, von Makrophagen gebildete, spezielle Proteasen, die Kollagen abbauen. Solche Matrix-Metalloproteasen (MMPs) werden auf Makrophagen und glatten Muskelzellen durch inflammatorische Zytokine vermehrt exprimiert. Füller et al. konnten zeigen, dass LPA monozytäre Zellen in sehr niedrigen Konzentrationen, im nanomolaren Bereich, stimuliert⁵⁷. Hieraus lässt sich eine Bedeutung von LPA auch für die Aufrechterhaltung von inflammatorischen Vorgängen ableiten. Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass LPA über den LPA₁ Rezeptor in Jurkat T-Zelllinien die Expression von MMPs verstärkt, jedoch über den LPA₂ Rezeptor eher abschwächt¹⁹⁶. Bezüglich der direkten Stimulation von LPA auf die vermehrte Expression von MMPs auf Makrophagen sind die publizierten Daten noch unklar. Füller konnte auf Mono Mac 6 Zellen jedenfalls keine vermehrte Expression von MMP-9 durch LPA nachweisen⁵⁶.

Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen neigen zur Kalzifizierung und Neovaskularisation. Das Einsprossen von kleinen Gefäßen aus der Media kann als Quelle weiterer inflammatorischer Zellen dienen¹⁰⁰. Eine wesentliche Rolle von ATX/lysoPLD und LPA hierbei erscheint durchaus denkbar. Die Ruptur solcher fragiler *microvessels*, vergleichbar einer retinalen Mikroeinblutung bei Diabetikern, führt zu einer *in situ* Thrombose mit konsekutiver Freisetzung verschiedener Mediatoren, z.B. PDGF und TGF- β ,

die die Rekrutierung von glatten Muskelzellen und die Matrix-Bildung stimulieren⁹⁵. So kann eine klinisch inapparente Mikroeinblutung zu plötzlichem Wachstum eines Plaques führen³⁷.

2.4.2 Plaqueruptur und Freisetzung von Thrombozyten-aktivierenden Substanzen

Verletzungen eines Plaques durch mikroskopische Schädigung des schützenden Endothels oder durch Ruptur der bindegewebigen Kappe führen zur Freisetzung zahlreicher thrombogener Substanzen^{50,51}.

Die Erosion einzelner Endothelzellen aufgrund verminderter Haftung an extrazellulärer Matrix, die durch die beschriebenen inflammatorischen Vorgänge in ihrer Integrität beschädigt wird¹³³ oder das Verschwinden einzelner Endothelzellen durch Apoptose¹⁰², führt zur Freilegung von subendotheliale Kollagen und von von Willebrand Faktor. Hierdurch wird Plättchenadhäsion und -aktivierung hervorgerufen⁵⁰. Obwohl eine solche mikroskopische Schädigung des Endothels oftmals klinisch unauffällig bleibt, schätzt man, dass hierdurch ein Viertel der tödlichen Koronarthrombosen hervorgerufen werden⁹⁵.

Die Plaqueruptur, also das Aufbrechen der bindegewebigen Kappe, ist für etwa drei Viertel der tödlichen Koronarthrombosen verantwortlich. Hierdurch gelangt der lipidreiche Plaquelkern mit dem Blutstrom in Verbindung. Der Lipidkern enthält u.a. die thrombogenen Substanzen *tissue factor*, Cholesterolsulfat und LPA^{95,107,153}. *Tissue factor* ist ein membranständiges Protein, das auf etlichen Zellen der Gefäßwand, z.B. Fibroblasten der Adventitia und glatten Muskelzellen der Media, nicht jedoch unter physiologischen Umständen auf Endothelzellen²⁵ exprimiert wird und mit dem Gerinnungsfaktor VII interagiert^{35,111}. Der Komplex aus TF und VIIa wird mittlerweile als wichtigster Initiator der Gerinnung unter physiologischen Bedingungen betrachtet⁴⁵. Der lipidreiche Kern atherosklerotischer Läsionen enthält einen hohen Anteil TF, gebunden an Mikropartikel¹⁰². Cholesterol-3-sulfat ist ein weiteres Molekül, das im lipidreichen Kern gehäuft vorkommt⁴², mit Thrombozyten interagiert und Thrombozytenadhäsion stimuliert. Außerdem verstärkt es die Aggregation durch ADP und Thrombin²¹. LPA akkumuliert ebenfalls im Lipidkern¹⁵³ und besitzt Thrombozyten aktivierende Potenz. Die Rolle von LPA für die Thrombozytenaktivierung durch lipidreiche atherosklerotische Plaques sowie die mögliche Bedeutung für die Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur ist bisher nicht bekannt und Gegenstand dieser Arbeit.

Neben den genannten Substanzen werden im Rahmen des Aufbrechens eines Plaques auch bindegewebige Komponenten wie Kollagen freigelegt. Hieran bindet zirkulierender vWF, der daraufhin seine Konformation verändert und sich zu Polymeren verkettet^{197, 38}. Kollagen und vWF sind wesentliche Initiatoren der Plättchenadhäsion und -aktivierung, wobei vWF v.a. bei hohen Scherkräften eine wichtige Bedeutung zukommt.

Jedoch bleiben wohl die meisten Ereignisse einer Plaqueruptur ohne klinische Folgen. Voraussetzung dafür ist das Überwiegen fibrinolytischer Mechanismen gegenüber prothrombotischer Aktivierung. In diesen Fällen kommt es zu einer begrenzten wandständigen Thrombusbildung und folgender bindegewebiger Reparatur. Hierbei spielt die Freisetzung von PDGF und TGF- β eine wesentliche Rolle⁹⁵.

Trotz der entscheidenden Bedeutung von Lipiden, Entzündungs- und Reparaturvorgängen bezüglich der Vulnerabilität eines Plaques, wird das Eintreten eines akuten ischämischen Ereignisses von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Variablen innerhalb und außerhalb des Plaques bestimmt. Als externe Einflüsse sind systemische prothrombotische Faktoren (z.B. erhöhte Fibrinogenkonzentration und Thrombozytenreaktivität), Vasospasmen, arterielle Hypertonie oder kritische Flußverlangsamung bekannt^{58,59,177}.

Insgesamt ist eine Plaqueruptur mit konsekutiver Thrombose ein sehr komplexer Prozess, der in seinen molekularen und zellulären Einzelheiten noch unzureichend verstanden ist.

2.5 Mechanismen der Thrombozytenaktivierung

Blutplättchen sind anukleäre Zellen und gewährleisten die Integrität des vaskulären Systems. Sobald es zu einer Läsion des Endothels kommt, werden sie aktiviert. Unter physiologischen Gegebenheiten sorgen sie, z.B. nach traumatischer Verletzung, für das Sistieren einer Blutung. In atherosklerotisch veränderten Gefäßen, deren Integrität durch Endothelschädigung oder Plaqueruptur gestört ist, kann es durch analoge Vorgänge zur Thrombozytenaktivierung und folgender Gerinnselbildung kommen. Hierbei unterscheidet man drei eng miteinander vernetzte Phasen: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation.

Während der Adhäsion werden Plättchen aktiviert und setzen Arachidonsäure und Thromboxan A₂ sowie Granulainhaltsstoffe frei. Letzteren Vorgang bezeichnet man als Sekretion. Hierbei werden zahlreiche, zumeist agonistische Substanzen, z.B. ADP, ATP und Serotonin freigesetzt. Diese Substanzen induzieren in zirkulierenden Thrombozyten zunächst eine Formveränderung (*shape change*), d.h. Sphärisierung der diskoiden Blutplättchen mit

Ausbildung von Pseudopodien und anschließend die primäre Aggregation. Aggregation nennt man den Vorgang von der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Man unterscheidet hierbei die primäre, noch reversible Aggregation und die sekundäre, irreversible Aggregation. Bei gleichzeitiger Stimulierung der Thromboxan-Bildung und Sekretion wird die Aggregation irreversibel⁶².

2.5.1 Adhäsion

Nach traumatischer Verletzung gesunder Blutgefäße wird die Adhäsion der Thrombozyten hauptsächlich durch Kollagen induziert. Hierbei sind v.a. die Kollagen-Typen I, III und VI wichtig, an die vWF bindet¹⁴². Zwei Membranglykoproteine (GP) der Plättchen, nämlich Integrin- $\alpha 2\beta 1$ (GPIa-IIa) und GPVI, interagieren direkt mit Kollagen. Sowohl $\alpha 2\beta 1$ als auch GPVI vermitteln Adhäsion und intrazelluläre Signale zur Plättchenaktivierung. Beide Kollagenrezeptoren stimulieren die zytosolische Tyrosinkinase Syk, welche die Aktivierung der Phospholipase C $\gamma 2$ durch Phosphorylierung bewirkt. Dadurch wird, über die Bildung von Inosit-1,4,5-trisphosphat, der zytosolische Ca²⁺-Spiegel erhöht^{84,186}. Die Aktivierung von Thrombozyten durch Kollagen wird kritisch durch das *platelet-endothelial adhesion molecule 1* (CD 31) gegenreguliert¹²⁹. Bei hohen Scherkräften über 1000/sec hängt die Thrombozytenadhäsion entscheidend von der Interaktion zwischen GPIb (vWF-Rezeptor) und kollagengebundenem vWF ab. Neben Kollagen sind Fibronektin und Laminin als weitere Adhäsionsproteine der extrazellulären Matrix zu nennen, für die Thrombozyten ebenfalls spezifische Rezeptoren besitzen^{167,172}.

2.5.2 Aktivierung und Gestaltwandel

Der *shape change* der Thrombozyten verläuft innerhalb von wenigen Sekunden nach Stimulation durch verschiedene Agonisten und dient wahrscheinlich v.a. der Vergrößerung der Membranoberfläche, Zentralisierung der sekretorischen Granula und optimalen Ausbreitung der Thrombozyten auf der subendothelialen Matrix⁶². Ausgelöst wird dieser thrombozytäre Gestaltwandel u.a. durch Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, wie im Falle von Thrombin, ADP, Thromboxan A₂, *platelet activating factor* (PAF) und LPA sowie nach Aktivierung von Glykoproteinrezeptoren, wie bei Kollagen.

Man unterscheidet vier generelle Subklassen der G-Proteine. G_s und G_i stimulieren bzw. inhibieren die Aktivität der Adenylatzyklase und steuern so den Spiegel an cAMP und damit die Aktivität der Proteinkinase A. Erhöhte cAMP Spiegel bewirken allgemein eine

Reduzierung der Reaktivität der Thrombozyten¹⁴⁹. G_q stimuliert die Phospholipase C_β und bewirkt dadurch eine Bildung von Inosit-1,4,5-trisphosphat und in Folge einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Hierdurch wird die Phospholipase A_2 aktiviert, die die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden katalysiert⁶². Arachidonsäure ist das Substrat der ASS-sensitiven Zyklooxygenase (COX-1), die Thromboxan A_2 bildet. Thromboxan A_2 entfaltet auto- und parakrine Wirkungen, verstärkt die Thrombozytenaktivierung und stimuliert die Sekretion von Granulainhaltsstoffen. Die vierte Subklasse der G-Proteine $G_{12/13}$ koppelt u.a. an die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie, die bei vielen Zellen an der Signaltransduktion von Reorganisationsprozessen des Zytoskeletts beteiligt sind¹⁸. So kann über Rho und die Rho-Kinase in Thrombozyten die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette initiiert werden, was deren Interaktion mit Aktinfilamenten ermöglicht. Die Stimulation dieses Signalweges ist unabhängig von Ca^{2+} und sorgt für Veränderungen des Aktinzytoskeletts, der Grundlage des *shape change*. Die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette kann jedoch auch durch einen zweiten Weg, nämlich Erhöhungen des zytosolischen Ca^{2+} hervorgerufen werden¹⁸. Die Adenylatzyklase und die Phospholipase C sind wesentlich an der Regulation des zytosolischen Ca^{2+} beteiligt.

LPA induziert in sehr niedrigen, nanomolaren Konzentrationen ($EC_{50} = 18$ nM) in Thrombozyten den Formwandel, und zwar über eine $G_{12/13}$ -abhängige Aktivierung der Rho-Kinase^{18,104,134}. LPA stimuliert auch während des *shape change* die Tyrosinkinase Src mit folgender Stimulation der Tyrosinkinase Syk¹⁰⁴. Solche Tyrosinkinasen sind im Allgemeinen für die intrazelluläre Ausbreitung und Amplifikation eines Signals in der Zelle verantwortlich und inhibieren oder aktivieren andere Proteine durch Übertragung von Phosphatresten auf bestimmte Aminosäurepositionen. Die genannten Tyrosinkinasen Src und Syk werden in Thrombozyten vermutlich über G_i aktiviert und vermitteln die vermehrte Exposition von Fibrinogen-Bindungsstellen auf dem Integrin $\alpha IIb\beta 3$, einer wesentlichen Voraussetzung für konsekutive Aggregation¹⁷.

Der thrombozytäre *shape change* kann, außer nach Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, auch durch Aktivierung von Glykoproteinrezeptoren, wie GPVI und Integrin- $\alpha 2\beta 1$, hervorgerufen werden. Wie oben beschrieben kommt es nach Aktivierung dieser Kollagenrezeptoren zur Aktivierung einer Phospholipase C_γ und über die zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung und Myosinleichtketten-Phosphorylierung mit folgender Veränderung des Aktin-Zytoskeletts^{11,22,128}.

2.5.3 Aggregation

Bei der nach dem *shape change* folgenden Aggregation kommt dem Glykoprotein GPIIb-IIIa (α IIb β 3)-Komplex eine zentrale Bedeutung zu¹⁹⁰. Nach Aktivierung des Thrombozyten kommt es im Bereich des GPIIb-IIIa zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen. Für die Bindung von Fibrinogen ist als Cofaktor Ca^{2+} notwendig. Über Fibrinogenbrücken entsteht so ein Mikroaggregat⁶². Neben Fibrinogen bindet das aktivierte GPIIb-IIIa auch noch andere, im Plasma vorhandene Adhäsionsmoleküle, wie vWF und Fibronectin und erreicht so eine weitere Rekrutierung von Thrombozyten¹⁴². Die initiale Bindung von Fibrinogen an GPIIb-IIIa ist ein reversibler Vorgang. Nach etwa 10-30 min folgt jedoch eine irreversible Fibrinogenbindung an den GPIIb-IIIa Komplex⁶².

Der Aggregation muss nicht unbedingt Gestaltwandel vorausgehen. Es gibt es auch Agonisten, wie Epinephrin oder Phorbol ester, die eine Aggregation hervorrufen können ohne einen vorhergehenden *shape change* der Blutplättchen¹⁴⁹.

3 Fragestellung der Arbeit

Lysophosphatidsäure ist eine Substanz, deren Thrombozyten aktivierende Wirkung seit längerer Zeit bekannt ist. Inzwischen kennt man mehrere LPA Rezeptoren - mindestens vier G-Protein gekoppelte membranständige Rezeptoren sowie einen intrazellulären Rezeptor - und hat zahlreiche Erkenntnisse über die intrazelluläre Signalverarbeitung nach Stimulation einer Zelle mit dieser Substanz gewonnen. Gleichwohl sind die LPA-Rezeptoren auf Thrombozyten, die für Aktivierung und Aggregation verantwortlich erscheinen, noch nicht näher charakterisiert. Die Entdeckung, dass LPA während der oxidativen Modifikation von LDL gebildet wird und in atherosklerotischen Läsionen akkumuliert, lässt eine Bedeutung von LPA bei der Entstehung und Manifestation der Atherosklerose vermuten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ziele erarbeitet:

- Die Pharmakologie der thrombozytären LPA Rezeptoren soll (a) durch die Testung bekannter und neuer LPA-Rezeptor-Antagonisten sowie (b) durch den Vergleich verschiedener LPA-Spezies bzw. LPA-Analoga auf *shape change*, intrazelluläre Calcium-Mobilisation und Aggregation näher charakterisiert werden.
- In atherosklerotischen Läsionen vorhandenes LPA soll qualitativ und quantitativ charakterisiert und bezüglich seiner Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung untersucht werden.
- Die Bedeutung von LPA bei der komplexen und multifaktoriellen Thrombozytenaktivierung durch Plaquematerial, wie sie z.B. im Rahmen einer Plaqueruptur geschieht, soll in einem *in vitro* Modell aufgeklärt werden.
- Anhand einer Fallstudie von Patienten mit symptomatischer und asymptomatischer Karotisstenose, die sich einer Thrombendarteriektomie unterziehen, sollen Hinweise auf die klinische Bedeutung von LPA gesammelt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Substanzen

1-[Oleoyl-9,10- ³ H]-Glycerophosphat	NEN				
1-Acyl-(16:0)-[d35]-Glycerophosphat	freundlicherweise Verfügung gestellt	von	G.	Tigyi	zur
1-Acyl-(16:0)-Glycerophosphat	Alexis Corp.				
1-Acyl-(18:1)-Glycerophosphat	Sigma				
1-acyl(heptadecyl(17:0)-2-hydroxy-glycero-3- pyrophosphate	freundlicherweise Verfügung gestellt ⁵³	von	G.	Tigyi	zur
1-Acyl-(18:1)- <i>sn</i> -2,3-cyclic-Glycerophosphat	freundlicherweise Verfügung gestellt ⁵³	von	G.	Tigyi	zur
1-Acyl-(20:4)-Glycerophosphat	freundlicherweise Verfügung gestellt ⁵³	von	G.	Tigyi	zur
1-Acyl-(8:0)-Glycerophosphat	freundlicherweise Verfügung gestellt ⁵³	von	G.	Tigyi	zur
1-Alkyl-(16:0)-Glycerophosphat	freundlicherweise Verfügung gestellt ⁵³	von	G.	Tigyi	zur
Aceton	Merck				
Acetylsalicylsäure	Sigma				
Adenosin-3'-Phosphat 5'-Phosphat	Sigma				
Adenosin-5'-Diphosphat	Sigma				
Albumin, bovin	Sigma				
Albumin, human	Sigma				
Apyrase	Sigma				
AR-C69931MX	AstraZeneca				
Butanol, <i>n</i> -Butanol	Merck				
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Merck				

Chloramphenicol	Sigma
Oxalsäure	Merck
Chloroform	Baker
Creatine Phosphat	Sigma
Creatine Phosphat Kinase	Sigma
D (+)-Glucose-Monohydrat	Merck
D-erythro-Sphingosin-1-Phosphat	Calbiochem
Diacyl-(18:0)-Glycerophosphat	Avanti Polar Lipids
Diacyl-(18:1)-Glycerophosphat	Avanti Polar Lipids
Diacyl-(18:1)-Glyceropyrophosphat	Avanti Polar Lipids
Diacyl-(18:1)-Glyceropyrophosphat	Avanti Polar Lipids
Diacyl-(8:0)-Glycerophosphat	Avanti Polar Lipids
Diacyl-(8:0)-Glyceropyrophosphat	Avanti Polar Lipids
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Eisessig	Merck
Epinephrin	Sigma
Ethanol, absolut	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Fibrinogen, human	Kordia
Formaldehyd-Lösung (37% w/v)	Sigma
Fura 2/AM	Calbiochem
Gentamicinsulfat	Sigma
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia
Heparin-Natrium (Liquemin® N 10000)	Hoffmann-La Roche
HEPES, N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethanosulfon-säure]	Sigma
Jod (doppelt sublimiert)	Merck

Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Kollagenreagens "Horm"	Nycomed Pharma
Kupfersulfat	Sigma
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Merck
Magnesiumchlorid	Merckl
Methanol, absolut	Merck
MRS2179	freundlicherweise von J. Bourguignon und P. Raboisson zur Verfügung gestellt
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
<i>N</i> -Palmitoyl-Serin-Phosphorsäure	Biomol
<i>N</i> -Palmitoyl-Tyrosin-Phosphorsäure	synthetisiert wie vorbeschrieben ¹⁹
Phalloidin, Rhodamin-gekoppelt	Molecular Probes
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Platelet activating factor (β-Acetyl-γ-O-Hexadecyl-L-α-Phosphatidylcholin)	Calbiochem
Poly-(L)-Lysin	Sigma
Salzsäure (37%)	Merck
<i>D-erythro</i> -Sphingosin-1-Phosphat	Calbiochem
Thiomersal	Sigma
Thrombin, human	Sigma
Triton X-100	Sigma
U46619	Sigma
YFLLRNP	Bachem Biochemica
Zitronensäure, Monohydrat	Sigma
Zitronensäure, Trinatriumsalz	Sigma

4.1.2 Puffer und Lösungen

Dialyse-Puffer:	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	0,05	%(w/v)	Chloramphenicol
			<i>pH = 7,4</i>
Puffer B:	20	mM	HEPES
	138	mM	NaCl
	2,9	mM	KCl
	1,0	mM	MgCl ₂
	0,36	mM	NaH ₂ PO ₄
			<i>pH = 6,2</i>
Puffer C:	20	mM	HEPES
	138	mM	NaCl
	2,9	mM	KCl
	1,0	mM	MgCl ₂
	0,36	mM	NaH ₂ PO ₄
	5	mM	Glucose
			<i>pH = 7,4</i>
ACD Puffer:	85	mM	Zitronensäure, Trinatriumsalz
	111	mM	Glucose
	65	mM	Zitronensäure, Monohydrat
Tyrode's Albumin Puffer:	137	mM	NaCl
	2	mM	KCl
	0,3	mM	NaH ₂ PO ₄
	12	mM	NaHCO ₃
	1	mM	MgCl ₂
	5	mM	Glucose
	10	mM	HEPES
	2	mM	CaCl ₂

	0,35	% (w/v)	Albumin, human <i>pH=7,3, Osmolarität 295 mOsm</i>
Fixierpuffer:	154	mM	Natriumchlorid
	0,16	% (w/v)	Formaldehyd
PBS Puffer	140	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8	mM	NaH ₂ PO ₄ <i>pH = 7,4</i>

4.1.3 Lipidpräparationen

Die verschiedenen langkettigen LPA-Spezies, S1P, NPSerPA, NPTyrPA und MAGDP wurden als 1 millimolare Stammlösung in Ethanol hergestellt und bei -20°C gelagert. Die weiteren Verdünnungen erfolgten am Versuchstag in Ethanol. Die Phospholipide PA (8:0), PA (18:0), PA (18:1), cPA (18:1), DGPP (8:0), DGPP (18:0), LPA (8:0) wurden als 10 milimolare Lösung in Methanol aufgenommen und im Verhältnis 1:10 mit Puffer (20 mM HEPES, 138 mM NaCl, bovines Albumin 0,25 mM) verdünnt und gelagert. Weitere Verdünnungsschritte erfolgten mit dem genannten Albuminpuffer. DGPP (8:0) und PA (8:0) konnten auch direkt in Albuminpuffer mit Konzentrationen von 1 - 4 mM resuspendiert werden. LPPA (1-acyl(heptadecyl(17:0)-2-hydroxy-glycero-3-pyrophosphate) ist sehr instabil, wurde in Chloroform gelagert und unter Stickstoffatmosphäre und Kühlung eingedampft, in Albuminpuffer resuspendiert und sofort verwendet.

4.2 Methoden

4.2.1 Plauegewinnung durch TEA und weitere Präparation

Gewebeproben atherosklerotischer Läsionen wurden im Rahmen gefäßchirurgischer Operationen, v.a. bei Thrombendarteriektomie (TEA) der Karotiden gewonnen. Das Einverständnis der Patienten und Genehmigung des Ethikkomitees des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München lagen vor. Dank eines besonders schonenden Operationsverfahrens²³, konnte die *en bloc* Struktur der Plaques erhalten bleiben.

Durch einen erfahrenen Gefäßchirurgen erfolgte die makroskopische Zerlegung des Plaques in verschiedene Anteile: normale Intima, Plaqueschulter, Plauekern und diffuse Intimaverdickung. Zum Teil wurden die Plaques in longitudinaler Richtung zerlegt und eine Hälfte histomorphologisch analysiert, um die beschriebene makroskopische Zuordnung auch mikroskopisch zu verifizieren. Einen Überblick gibt Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1:

Intima Region	Definition	Typ der Läsion*
Normale Intima	Normal strukturierte bzw. nicht signifikant verdickte Intima, intakte Lamina elastica interna	0/I
Plaue Schulter	Übergangszone zwischen normaler Intima und Plaue Kern mit Verdickung der Intima durch Anhäufung von Zellen und extrazellulärer Lipide, kein Nekrosekern	II/III
Plaue Kern	Zentraler Teil der Stenose mit lipid-reichem, nekrotischen Kern, maximaler Intimaverdickung, oft mit haemorrhagischer Einblutung, intramuraler Thrombose oder verletzter Oberfläche der Läsion	V/VI
Diffuse Intimaverdickung	Glatte Läsion proximal der Kernregion mit diffuser Intimaverdickung durch extrazelluläre Lipide sowie Kollagen- und glatte Muskelfasern	III/IV

Definition der unterschiedlichen Intimaregionen eines Plaues. Tabelle erstellt nach Brandl et al.²³. *Typ der Läsion nach den Empfehlungen des *Committee on Vascular Lesions of the Council of Atherosclerosis, American Heart Association*¹⁵⁷.

Die Gewebeproben wurden im Operationssaal in Plastikgefäße mit PBS und EDTA (1mM) aufgenommen, ggf. wenige Stunden gekühlt gelagert, gewaschen, gewogen und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Aus besonders weichen Plaques wurde der Kernanteil nach vorsichtiger Längsteilung mit einem scharfen Skalpell eröffnet und das lipidreiche Material stumpf herauspräpariert. Nach Wägen erfolgte Homogenisierung in eiskaltem, Stickstoff gesättigten Puffer mit 150 mM NaCl und 1mM EDTA.

4.2.2 Lipidisolierung und Extraktion von LPA

Zur weiteren Lipidisolierung wurden die Plaques, bzw. die o.g. Plaquateile mit einem Skalpell unter sterilen Bedingungen zerkleinert, mit einem Potter in eiskaltem, Stickstoff gesättigten Puffer mit 150 mM NaCl und 1 mM EDTA (ca. 50 mg Plaque/1 ml Puffer) mechanisch homogenisiert und in ein PP-Plastikgefäß (sog. *Falcon-Tubes*) gegeben.

Es wurden zwei verschiedene Protokolle zur Lipid- bzw. LPA Extraktion angewendet. Grundsätzlich sind beide Protokolle ausgefeilte Abwandlungen der Trennung von Lipiden nach Bligh und Dyer (1959). Ihr Prinzip ist die unterschiedliche Löslichkeit von bestimmten Lipiden in verschiedenen Lösungsmitteln. LPA ist ein eher hydrophiles Molekül, das sich in wässrigen Medien, aber auch z.B. in Ethanol lösen lässt. In stark lipophilen Lösungsmitteln, wie Chloroform, lässt sich LPA, zumindest bei normalen oder alkalischen pH-Werten, nicht lösen. Die weitere Auftrennung der Lipide erfolgte ggf. durch Dünnschichtchromatographie (TLC) oder eine Kombination von Lipidchromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS, siehe 4.2.3).

Dem Plaquehomogenat wurde zu Beginn Tritium markiertes [Oleoyl-9,10-³H]-LPA zugegeben. Eine entsprechende Menge des radioaktiv markierten Standards wurde in ein Szintillationsgefäß mit Szintillationsflüssigkeit überführt und die Radioaktivität gemessen. Hierfür benutzte man ein Szintillationszählgerät der Firma Pharmacia (Typ: Wallac 1510). Auf den gemessenen Wert bezogen sich die später gemessenen Werte der verbliebenen Radioaktivität (*recovery*). Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten entsprechend den geltenden Arbeitsschutzbestimmungen für Versuche mit schwach radioaktivem Material.

Im ersten Protokoll wurde dann dem Plaquehomogenat 1 ml Chloroform/BHT und 2 ml Methanol zugegeben. Nach sorgfältigem Schütteln und 15 minütigem Stehen lassen bei Raumtemperatur wurden 1 ml H₂O und 3 ml Chloroform/BHT zugegeben. Nach sorgfältigem

Schütteln erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 4000 rpm und 20 °C für 10 min.

Die untere Chloroformphase wurde vorsichtig mit Spritzen abgezogen und in separate *Falcon-Tubes* überführt. Die obere, wässrige Phase wurde, wie beschrieben, noch zweimal mit je 2 ml Chloroform gewaschen und zentrifugiert. Die unteren Chloroformphasen wurden kombiniert. Aus diesen knapp 8 ml Chloroform wurden 0,2 ml entnommen, in ein Szintillationsgefäß überführt und im Wasserbad bei 55° C unter Stickstoffatmosphäre eingedampft. Nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurde die *recovery* gemessen.

Die obere Phase und die Interphase wurden nach Durchmischung mittels Vibrationsmixer bei 55° C unter Stickstoffatmosphäre auf weniger als 1 ml eingedampft. Das Volumen wurde dann durch Zugabe von H₂O *bidest.* auf exakt 1 ml aufgefüllt. Nun erfolgte Zugabe von 10 mM EDTA (final) und 0,1 M HCl zum Ansäuern auf einen pH = 4. Nach einminütiger Durchmischung mittels Vibrationsmixer wurden 2,5 ml Butanol (H₂O gesättigt) hinzu gegeben und erneut durchmischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugieren bei 4000 rpm und 20 °C für 10 min. Der Überstand (Butanolphase) wurde sorgfältig abgezogen und die untere Phase, entsprechend, nochmals mit 2,5 ml Butanol gewaschen. Die Überstände kombinierte man. Hieraus wurden 20 µl entnommen und die Radioaktivität bestimmt.

Die Butanolphase wurde dann unter Stickstoffatmosphäre bei 55 °C eingedampft. Der Rand der PS-Gefäße wurde mit 650 µl sorgfältig gespült, geschüttelt, kurz zentrifugiert und das Ganze in 1 ml Gefäße überführt. Unter Stickstoffatmosphäre und bei 55 °C erfolgte nochmaliges Eindampfen der Proben. Nach sorgfältiger Resuspension in 100 µl Butanol wurde erneut die *recovery* aus 2 µl der Lösung bestimmt. Zum Schutz vor Oxidation wurde 1 µl einer 100 mM EDTA Lösung zugegeben. Nach Eindampfen erfolgte dann die Resuspension in 20 µl H₂O gesättigtem Butanol. Diese Proben konnten dann weiter mittels unten genannter Methoden differenziert bzw. analysiert werden.

Im zweiten Protokoll, modifiziert nach Bjerve²⁰ und Baker¹⁴, wurde das homogenisierte Plaquematerial mit einem eiskalten Zitronensäure-Phosphat-Puffer (Zitronensäure 30 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, pH=4) im Verhältnis 1:3 (Homogenat:Puffer) versetzt. Dann erfolgte Zugabe des radioaktiv markierten Standards [³H]-LPA wie oben beschrieben bzw. für spätere LC-MS Analysen Zugabe von deuteriertem [²H]-LPA (16:0-*d*35). Nach Zugabe von 4 ml Butanol wurde das Gefäß kräftig geschüttelt und dann Stehen gelassen bis Phasentrennung eintrat. Dieser Schritt wiederholte man noch zweimal. Dann erfolgte Zentrifugation mit 3000

g für 5 min bei 4°C. Die organische Phase wurde sorgfältig abgenommen und die verbliebene Interphase nochmals wie beschrieben mit 2 ml Butanol (H₂O gesättigt) gewaschen. Nach Zusammenführung der organischen Phasen erfolgte erneut die Bestimmung der *recovery*. Die wässrige Phase wurde verworfen. Das LPA befand sich, bedingt durch die Ansäuerung und somit Sättigung der polaren Phosphatgruppe, in der organischen Phase.

Die Butanolphase wurde unter Stickstoff eingedampft und in 1 ml Chloroform-Methanol-Wasser (100 : 1,2 : 0,6) - Gemisch resuspendiert. Nun wurde nochmals die *recovery* bestimmt und das Lipidextrakt zur Lagerung in verschraubbare Glasküvetten überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C unter Stickstoffatmosphäre.

Der Vorteil des zweiten Protokolls, modifiziert nach Bjerve und Baker, lag in der höheren *recovery*, die stets zwischen 80-90% lag.

Für funktionelle Experimente wurde ein Teil der Probe unter Stickstoffatmosphäre, wie beschrieben oder mittels Vakuumzentrifuge, eingedampft und in Ethanol (75%) oder BSA Puffer mit 10% Methanol resuspendiert. Unmittelbar vor jeder Messreihe erfolgte erneute Bestimmung der *recovery*.

Eine weitere Lipiddifferenzierung und -analyse fand dann mittels Dünnschichtchromatographie oder ESI-LC-MS statt.

4.2.3 Lipiddifferenzierung mittels Dünnschichtchromatographie

Die weitere Auftrennung der Lipide erfolgte u.a. mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (TLC). Es wurden Kieselgelplatten der Firma Whatman (60 Å, 250 µm Normalphasen DC-Platten mit Auftragstreifen) verwendet. Nach 45minütiger Vorinkubation der TLC-Platte im Ofen bei 85 °C und kurzem Auskühlen und Imprägnierung mit Oxalsäure (500 mM in Methanol) wurden die Proben vorsichtig aufgetüpfelt. Die leeren Probengefäße wurden nochmals mit 10 µl Butanol (H₂O gesättigt) ausgespült, anzentrifugiert und der Rest ebenfalls aufgetüpfelt. Zusätzlich wurden zwei Spuren mit 20 µl oleoyl-LPA (einer 1mM Stammlösung) als Standard belegt. Die Laufkammer wurde währenddessen mit frischem Laufmittel nach Sugiura et al.¹⁶⁰(Chloroform : Aceton : Methanol : Eisessig : Wasser = 9 : 4 : 2 : 2,6 : 1) gefüllt, so dass der Kammerboden ca. 0,5 cm tief bedeckt war. Die Chromatographie fand im Kühlraum bei 4 °C statt. Es wurde dann ca. 1 Stunde gewartet, damit sich eine gleichmäßige Atmosphäre in der Kammer bilden konnte. Die Platte wurde dann vorsichtig in die Kammer gestellt, wobei die Auftragsseite zur Kammerinnenseite

zeigte. Die Chromatographie wurde abgebrochen, sobald das Laufmittel etwa fingerbreit bis an die Plattenoberkante reichte.

Schließlich wurde die Platte luftzugsfrei getrocknet, um eine Verfälschung durch unterschiedliche Trocknungsgeschwindigkeit zu minimieren und in eine Schutzfolie gelegt.

Zur Detektion des radioaktiven ^3H -LPA wurde ein TLC-Linear-Analysegerät der Firma EG & G (Bad Wildbad) verwendet.

Mittels Anfärbung in einer Kammer mit sublimiertem Jod wurden ungesättigte Doppelbindungen sichtbar gemacht. Um die schwache Färbung abzusichern, wurde ein spezieller Auflichtscanner mit entsprechender Software benutzt. Die Nachbearbeitung der Grafikdatei erfolgte mit dem Programm Photoshop der Firma Adobe. Die Detektion von LPA mit Hilfe anderer Färbemethoden, z.B. mit Primulin, das mit der freien Phosphatgruppe interagiert, waren zu unspezifisch und im Vergleich mit der Jod-Färbung unterlegen.

Der interessante Bereich, d.h. der radioaktive Peak $\pm 0,5$ cm bzw. die angefärbte Höhe des mitgelaufenen Standards, wurde mit einem breitklingigen Skalpell abgekratzt, in ein 1 ml Gefäß überführt und mit 1 ml Butanol versetzt. Nach gründlicher Mischung mittels Vibrationsmischer und einstündiger Inkubation und Schüttelung im Thermomixer bei 45 °C erfolgte Zentrifugation bei 13.000 U für 5 min. Der Überstand wurde abgezogen. Das verbliebene Kieselgel wurde analog nochmals mit 1 ml Butanol ausgewaschen. Der kumulierte Überstand wurde dann unter Stickstoffatmosphäre bei 55 °C eingedampft und in 100 μl Butanol erneut gelöst. Nach Bestimmung der verbliebenen Radioaktivität aus 2 μl konnte der isolierte LPA Anteil berechnet werden.

Für funktionelle Experimente wurden die Proben erneut eingedampft und in 20 μl Ethanol (75%) oder BSA Puffer mit 10% Methanol resuspendiert. Unmittelbar vor jeder Messreihe erfolgte erneute Bestimmung der *recovery*.

4.2.4 Lipidanalyse mittels ESI-LC-MS

Elektrospray-Ionisierung und Lipidchromatographie-Massenspektrometrie (ESI-LC-MS) ist eine Methode, bei der Techniken der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie verbunden werden.

Die ESI-LC-MS Analyse wurde dankenswerter Weise von D.L. Baker und G. Tigyi, *University of Tennessee Health Science Center*, nach einem von ihnen publiziertem

Protokoll¹⁴, durchgeführt. Die Lipidextrakte mit deuteriertem Standard wurden als o.g. Chloroform-Methanol-Wasser Gemisch auf Trockeneis hierzu nach Memphis (Tennessee, USA) verschifft.

4.2.5 Präparation von LDL (*low-density lipoprotein*)

Es erfolgte venöse Blutentnahme (400 ml) von nüchternen Probanden. Zur Antikoagulation wurde EDTA (2,7 mM final) verwendet. Durch Zentrifugation bei 1500 g und 4°C für 30 min wurde Plasma gewonnen, abpipettiert und mit NaN₃ (7,7 mM), Gentamicinsulfat (0,11 mM), Thiomersal (0,25 mM) und Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (1 mM) versetzt. LDL (d=1,019 bis 1,063 g/ml) wurde durch sequentielle Ultrazentrifugation mittels eines Beckman Ti 50.2 Rotors nach einer Methode von Schumaker/Puppione¹⁴⁸ gewonnen. Hierbei wurden EDTA (1 mM), NaN₃ (2 mM), Thiomersal (0,25 mM), Gentamicinsulfat (0,11 mM), Chloramphenicol (0,25 mM), Benzamid (1 mM) und Glutathion als Schutz vor Oxidation bzw. als bakteriostatische Substanzen zugegeben (0,5 mM). Dann wurde das LDL gegen 15 l N₂ gesättigten Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert, steril filtriert (0,22 µm) und bei 4 °C unter Licht-Ausschluss und Stickstoffatmosphäre gelagert. Der Proteingehalt des LDL wurde nach einer modifizierten Lowry Methode¹⁰³ bestimmt. Bovines Serum-Albumin diente als Vergleichsstandard.

Um EDTA freies LDL zu erhalten, wurde dialysiertes LDL über eine Econo-Pac 10 DG Säule der Firma Biorad geleitet, in PBS aufgefangen und schließlich mittels Zentrifugation in einem Centricon-100 Konzentrator der Firma Amicon auf 20 mg Protein/ml eingestellt.

Zur milden Oxidation von LDL (mox-LDL) wurde EDTA freies LDL (20 mg Protein/ml) mit CuSO₄ (640 µM final) versetzt und in einem Eppendorf-Thermomixer unter leichtem Schütteln bei 37 °C über 20 h oxidiert.

Minimal modifiziertes LDL (mm-LDL) entstand durch spontane Oxidation unter Anwesenheit von 1 mM EDTA während Lagerung bei 4 °C über ein bis vier Monate.

4.2.6 Präparation humaner Thrombozyten

Zur Gewinnung humaner Thrombozyten wurde peripher-venöses Blut von gesunden Probanden, nach vorheriger Aufklärung und Einverständniserklärung, mittels 18 G Butterfly-Kanüle aus der *V. cubitalis* entnommen. 14 Tage vor Blutentnahme durften die Probanden keinerlei Medikamente eingenommen haben. Ausgenommen war die „Pille“. Je nach

Fragestellung wurden verschiedenen Protokolle zur Thrombozytenpräparation verwendet. Die Wasch- bzw. Resuspensionspuffer waren stets auf 37 °C vorgewärmt.

Thrombozytenpräparation nach Negrescu¹¹⁸ et al. mit ASS:

Die folgende Methode wird in der weiteren Arbeit als Standardpräparation bezeichnet. Sie eignet sich besonders gut zur Messung von Gestaltwandel (*shape change*). Zur Antikoagulation wurde Natriumcitratlösung (3,13 % w/v) im Verhältnis 1:10 des Blutvolumens verwendet. Die Blutentnahme erfolgte in 50 ml Perfusor-Spritzen der Firma Braun mit entsprechend vorgelegter Natriumcitratlösung. Das antikoagulierte Blut wurde vorsichtig auf 50 ml PP-Röhrchen verteilt und bei 180 g und 24 °C für 20 min zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) im Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und nach Zugabe von Acetylsalicylsäure (1 mM final) und Apyrase (0,3 U/ml final), einer Phosphodiesterase, die ADP abbaut, für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Bei einigen Präparationen unterblieb die Inkubation mit ASS. Nach Zugabe von Zitronensäure (9 mM final) und EDTA (5 mM final) erfolgte die Pelletierung der Thrombozyten durch Zentrifugation bei 800 g und 24 °C für 20 min. Der Überstand (plättchenfreies Plasma) wurde abgenommen und verworfen. Die Resuspension der Thrombozyten erfolgte dann in Puffer B mit 0,6 U/ml Apyrase in ca. 10% des Volumens des Vollblutes. Hierzu wurde 1 ml Puffer B mit der vollständigen Menge der Apyrase vorgelegt und sehr sorgsam mit der Resuspension der Plättchen begonnen. Die restliche Menge Puffer B wurde anschließend hinzugegeben. Die Zählung der Thrombozyten erfolgte dann, nach Entnahme eines Aliquots und Verdünnung in Thrombo-Plus-Spezialzähllösung der Firma Sarstedt, mittels Neubauer-Zählkammer und Phasen-Kontrast-Mikroskopie. Nach erneuter Zentrifugation bei 800 g und 24 °C erfolgte die entsprechende Resuspension in Puffer C mit 0,6 U/ml Apyrase. Das Resuspensionsvolumen wurde in der Regel so gewählt, dass eine finale Thrombozytenkonzentration von 400/nl vorlag. Vor der Durchführung funktioneller Experimente wurden die Blutplättchen stets 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Thrombozytenpräparation nach Gueguen et al.⁶⁹:

Für einige Experimente erfolgte die Thrombozytenpräparation nach einem Protokoll von Gueguen et al⁶⁹. Es eignet sich v.a. zur Beobachtung der Aggregation. Zur Antikoagulation wurde Natriumcitratlösung (3,13 % w/v) im Verhältnis 1:10 des Blutvolumens verwendet. Die Blutentnahme erfolgte in 50 ml Perfusor-Spritzen der Firma Braun. Citrat-PRP wurde durch Zentrifugation bei 180 g und 24 °C für 20 min gewonnen und vorsichtig abpipettiert.

Dieses PRP wurde dann durch Zugabe von ACD-Puffer (etwa im Verhältnis ACD-Puffer: PRP = 1:10 bis 1:15) auf einen pH von 6,4 angesäuert. Die Pelletierung der Thrombozyten erfolgte durch Zentrifugation bei 800 g und 24 °C für 20 min. Schließlich wurden die Plättchen sehr vorsichtig in Puffer C resuspendiert. Apyrase wurde nicht hinzugefügt. Die Resuspension erfolgte zuerst in ca. 10% des Volumens vom Vollblut. Nach Zählung, wie oben beschrieben, wurden die Plättchen auf eine finale Konzentration von 400/nl verdünnt. Nach 30 min Ruhen bei Raumtemperatur konnten die Thrombozyten für etwa 2 Stunden verwendet werden. Danach kam es zu einer deutlichen Abnahme der Sensitivität. Insgesamt erfordert diese Präparation ein besonders sorgsames Vorgehen, da es u.a. durch freigesetztes ADP leicht zu einer artifiziellen Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten während der Wasch- und Resuspensionsvorgänge kommen kann.

Thrombozytenpräparation modifiziert nach Cazenave et al.²⁶:

Die Blutentnahme erfolgte vorsichtig mit einer 18G-*Butterfly*-Kanüle direkt in 50 ml PP-Röhrchen, die ACD-Puffer im Verhältnis 1:6 enthielten. Der finale pH-Wert lag bei 6,5 mit einer Citratkonzentration von 22 mM. Die ersten Milliliter des entnommen Blutes wurden verworfen um Verunreinigungen mit Gewebsthromboplastin zu verhindern. Das Blut wurde vorsichtig entlang der Wand des Röhrchens laufengelassen, um Luftblasenbildung zu verhindern. Sofort nach der Blutentnahme wurden die Röhrchen verschlossen, mehrmals geschwenkt und im Wasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert. Zur Gewinnung von PRP erfolgte die Zentrifugation bei 180 g und 37°C für 15 min. Das PRP wurde dann vorsichtig abpipetiert und bei 37°C für 15-30 min im Wasserbad inkubiert. Zur Pelletierung der Thrombozyten erfolgte die Zentrifugation bei 1570 g und 37°C. Die Zentrifugationszeit war dabei von der Menge an PRP pro Röhrchen abhängig (siehe Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2:

Plasmamenge (ml)	15	20	25	30	35	40
Zentrifugationszeit (min)	10	12	13	14	15	16

Zentrifugationszeiten des plättchenreichen Plasmas (nach Cazenave et al.²⁶).

Der Überstand (plättchenarmes Plasma) wurde sorgfältig und vollständig entfernt um Verunreinigungen durch Thrombin zu minimieren. Anschließend erfolgte die Resuspension in vorgewärmtem (37° C) Tyrode's-Albumin 0,35 % Puffer, der zusätzlich 1 µM PGI₂ und 2 U/ml Lepirudin enthielt. Zur Resuspension wurde Puffer etwa im Verhältnis 1:5 des ursprünglich eingesetzten Blutes verwendet. Nach einer Inkubation von 10 min im Wasserbad

bei 37° C erfolgte die nochmalige Zugabe von 1 µM PGI₂. Dann erfolgte die erneute Pelletierung der Blutplättchen bei 1100 g und 37° C für 8 min. Die Methode nach *Cazenave et al.* wurde nun folgendermaßen modifiziert (*Rother et al.*¹⁴¹) Die Resuspension erfolgte in vorgewärmtem, Albumin-freien Waschpuffer C (mit 0,6 U/ml Apyrase). Zur Zählung der Thrombozyten wurde, wie oben beschrieben, eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Nach erneuter Zentrifugation bei 1100 g und 37° C für 8 min erfolgte die Resuspension in vorgewärmtem, Albumin-freien Puffer C. Die Thrombozytenzahl wurde auf 300.000/µl eingestellt. Vor Stimulation der Thrombozyten erfolgte die Zugabe von Fibrinogen (0,5 mg/ml). Die Lagerung der Thrombozyten erfolgte bei Raumtemperatur in verschlossenen Gefäßen. Der Vorteil dieser modifizierten Methode nach *Cazenave et al.* liegt in der höheren Sensitivität der Plättchen gegenüber verschiedenen Agonisten, besonders im Hinblick auf die Aggregation. Im Vergleich zur Methode nach *Gueguen* kam es seltener zur spontanen Thrombozytenaktivierung während Präparation oder Rühren der Suspension. Die Thrombozyten konnten für maximal 5 h zur turbidometrischen Messung von Gestaltwandel und Aggregation verwendet werden.

4.2.7 Turbidometrische Messung von Gestaltwandel und Aggregation

Hierbei handelt es sich um eine Methode, die die Lichttransmission einer gerührten Thrombozytensuspension misst. Durch Sphärisierung (*shape change*) der initial diskoiden Blutplättchen kommt es zu einer Minderung der Lichttransmission und Abnahme der Basal-Oszillationen. Durch Aggregation nimmt die Anzahl der korpuskulären Bestandteile der Suspension ab und folgend die Lichttransmission zu.

Die Messung erfolgte mittels eines LABOR-Aggregometers der Firma Fresenius. Dieses Gerät verwendet Weißlicht einer Wolframlampe und eine Photoelektrode zur Transmissionsmessung. Nach zweiminütiger Inkubation im eingebauten Thermoblock bei 37 °C wurde die PS-Küvette mit mindestens 0,4 ml der Thrombozytensuspension in den Strahlengang gebracht. Das Rühren erfolgte durch ein kleines, 7 mm langes Magnetrührstäbchen mit einer Geschwindigkeit von 1200 U/min. Mittels eines speziellen 2-Kanal-Schreibers erfolgte die Dokumentation der Lichttransmission. Agonisten oder Antagonisten wurden frühestens 1 min nach Beginn des Rührens hinzu gegeben um eine stabile Basallinie und konstante Scherkräfte zu gewährleisten. Die Inkubation mit Antagonisten erfolgte nach initialem Rühren zum Teil im Thermoblock. Die exakten Protokolle im Einzelnen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Die Quantifizierung von *shape change* oder Aggregation erfolgte durch Ausmessen der Abweichung der Lichttransmission von der Basallinie in mm. Die maximale Abnahme der Lichttransmission bei vollständigem Gestaltwandel bzw. maximale Zunahme der Lichttransmission bei Aggregation (durch einen bestimmten Agonisten) wurden hierbei als 100% Wert definiert und die weiteren Messwerte dazu ins relative Verhältnis gesetzt. Die Verstärkung des Signals wurde jeweils so gewählt bzw. dokumentiert, dass mehrere Messreihen miteinander vergleichbar waren.

Zur absoluten Bestimmung der Veränderung der Lichttransmission, wurde die Basallinie der Thrombozytensuspension als Nullwert und Puffer C (Suspensionsmedium) als 100% Wert der Lichttransmission definiert.

4.2.8 Messung der Thrombozytenaggregation in Vollblut

Es wurde peripher-venöses Blut von gesunden Probanden, nach vorliegender Einverständniserklärung, mittels 18 G Butterfly-Kanüle aus der *V. cubitalis* entnommen. Zur Antikoagulation wurde Natriumcitratlösung (3,13% w/v) im Verhältnis 1:10 des Blutvolumens verwendet. Das Blut wurde bei Raumtemperatur (ca. 24 °C) in PP-Plastikgefäßen gelagert. 0,4 ml des antikoagulierten Blutes wurden dann in eine PS-Rührküvette überführt und im Thermoblock des o.g. LABOR Aggregometers für 2 min bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte Platzierung der Küvette in der Röhreinrichtung und Anschalten des Rührstäbchens auf 400 rpm. Hemmsubstanzen oder Kontrolllösungen wurden sofort hinzugegeben. Nach ca. 15 sec erfolgte die Zugabe von Agonisten, z.B. LPA oder Plaquehomogenat, worauf sofort ein Aliquot (15 µl) in ein Eppendorf-1 ml-Plastikgefäß mit Fixierpuffer (30 µl) als Ausgangswert ($t = 0$) überführt wurde. Anschließend wurden entsprechende Aliquots im zeitlichen Verlauf entnommen. Die fixierten Proben wurden dann weiter mit 0,9% NaCl verdünnt und hieraus die verbliebenen einzelnen Thrombozyten mit einer elektronischen Zählmaschine (Sysmex Platelet Counter PL-100, TOA medical Electronics, Kobe, Japan) quantifiziert. Hierbei wird die verdünnte Vollblutprobe hydrodynamisch zentriert zwischen Elektroden geleitet und die elektrische Impedanz gemessen. Die Amplitude des jeweiligen Strompulses korreliert mit der Größe der gemessenen Partikel. So können Thrombozyten von Erythrozyten differenziert werden¹³.

Ausgewertet wurde die relative Abnahme der Thrombozytenzahl im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von Agonisten und ggf. Antagonisten.

4.2.9 Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration mittels Fluorometrie

Zur Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration wurden die Thrombozyten, wie unter 4.2.6 beschrieben (Negrescu et al.¹¹⁸) präpariert und in Puffer C mit einer Konzentration von 1000/nl resuspendiert. Dieser Suspension wurde 0,1% (w/v) bovines Albumin (BSA), 0,6 U/ml Apyrase und 4 μ M Fura 2/AM, in DMSO, zugesetzt. Vor Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes wurden 0,5 ml der Suspension in ein separates Gefäß überführt und mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO zur späteren Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz versetzt. Nach 45 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad erfolgte nochmalige Pelletierung der Plättchen bei 800 g und 24°C für 20 min und vorsichtige Resuspension in Puffer C mit 0,1 % BSA und 0,6 U/ml Apyrase auf eine Thrombozytenkonzentration von 1000/nl. Die Markierung, Inkubation und folgende Lagerung der Thrombozyten erfolgte unter Lichtausschluss. Derart markierte Thrombozyten wurden frühestens nach 20 min und maximal bis zu 3 h nach Abschluss der Präparation verwendet um Messwertverzerrungen durch zeitabhängigen Verlust von Fura-2 ins umgebende Medium zu minimieren.

Fura 2/AM ist die membrangängige Esterform des Calcium-Chelators und Fluoreszenzfarbstoffes Fura 2. Bei Fura 2/AM sind die Carboxylfunktionen durch Methoxygruppen maskiert. Der dadurch lipophile Charakter des Moleküls ermöglicht ungehinderte Diffusion ins Zytosol, wo anschließend durch zelluläre Esterasen der eigentliche Farbstoff freigesetzt wird.

Fura 2 verschiebt in Abhängigkeit von der vorliegenden Calcium-Konzentration sein Absorptionsmaximum von 362 nm (für das freie Anion) auf 336 nm (für den Ca^{2+} -Komplex). Das Emissionsmaximum liegt, weitgehend unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration, bei 510 nm im gelb-grünen Bereich des sichtbaren Spektrums⁶⁸. Durch Bestimmung der Intensität des emittierten Lichtes nach vorheriger Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes bei den o.g. Absorptionsmaxima können Rückschlüsse auf die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration gewonnen werden (siehe Abb. 4-1).

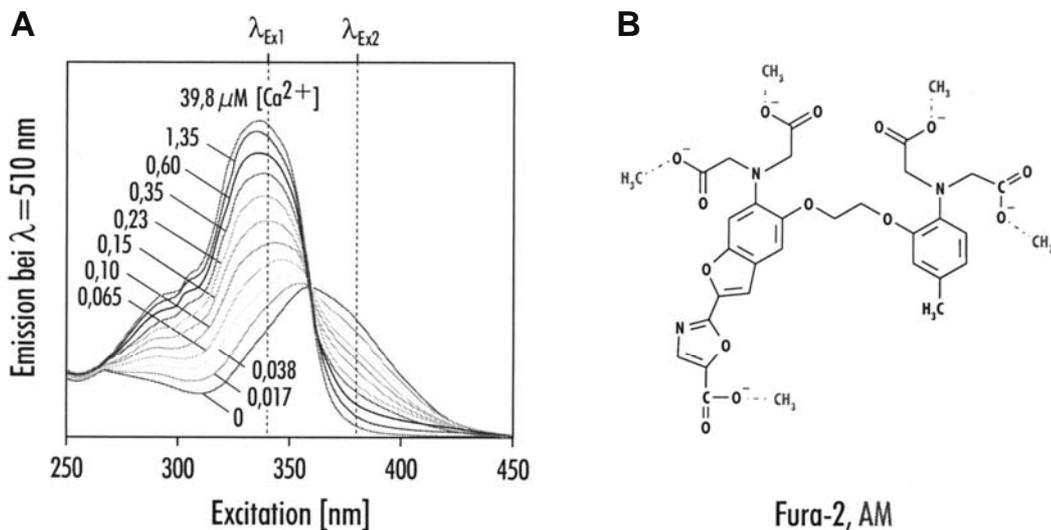


Abbildung 4-1: (A) Exzitationsspektren von Fura-2 in Abhängigkeit von verschiedenen Calciumkonzentrationen. λ_{EX1} und λ_{EX2} bezeichnen die zur Messung verwendeten Anregungswellenlängen. (B) Chemische Struktur von Fura-2 bzw. des zellpermeablen Derivats Fura-2-AM. Maskierung der Carboxylfunktionen durch Methoxygruppen bei Fura-2-AM (*gestrichelt*).

Es gelte die Annahme, dass sich die emittierte Fluoreszenz F eines Farbstoffes proportional zu seiner Konzentration c verhalte. Die Schichtdicke der untersuchten Probe und die Konzentration des Farbstoffes seien hierfür hinreichend gering.

$$F = c \cdot S$$

S ist hierbei der Proportionalitätskoeffizient und das Produkt aus Extinktionsintensität, $\ln 10$, Extinktionskoeffizient, Schichtdicke, Quantumeffizienz und Effizienz des detektierenden Instruments für emittierte Photonen.

Für den benutzten Farbstoff Fura 2 benötigt man vier Proportionalitätskoeffizienten: S_{f1} für den freien Farbstoff bei Wellenlänge λ_1 , S_{f2} für den freien Farbstoff bei λ_2 sowie S_{b1} und S_{b2} für den Ca^{2+} gebundenen Farbstoff bei λ_1 und λ_2 .

In einer Mischung aus freiem und Ca^{2+} gebundenem Farbstoff mit den Konzentrationen c_f und c_b gilt für die emittierte Fluoreszenzintensität der Wellenlängen λ_1 und λ_2 :

$$F_1 = S_{f1} \cdot c_f + S_{b1} \cdot c_b$$

$$F_2 = S_{f2} \cdot c_f + S_{b2} \cdot c_b$$

c_f und c_b sind, unter Annahme einer 1:1 Komplexierung, mit der Ca^{2+} Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]$ verbunden,

$$c_b = c_f \cdot [\text{Ca}^{2+}] / K_d$$

wobei K_d die effektive Dissoziationskonstante des Farbstoffes bezeichnet. Da Fura 2 unterschiedliche Absorptionsmaxima für den Ca^{2+} gesättigten Komplex und das freie Anion besitzt können jeweils Wertepaare der beobachteten Emission gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt werden.

$$\begin{aligned} R &= F_1 / F_2 \\ &= (S_{f1} \cdot c_f + S_{b1} \cdot c_b) / (S_{f2} \cdot c_f + S_{b2} \cdot c_b) \\ &= (S_{f1} + S_{b1} \cdot [\text{Ca}^{2+}] / K_d) / (S_{f2} + S_{b1} \cdot [\text{Ca}^{2+}] / K_d) \end{aligned}$$

Die Auflösung nach $[\text{Ca}^{2+}]$ ergibt:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - (S_{f1}/S_{f2})}{(S_{b1}/S_{b2}) - R} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

S_{f1}/S_{f2} entspricht R bei $[\text{Ca}^{2+}] = 0$ und wird als R_{\min} definiert. Analog entspricht S_{b1}/S_{b2} gesättigten Calciumbedingungen und wird als R_{\max} bezeichnet.

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Der Vorteil dieser Gleichung liegt darin, dass die gemessene Ca^{2+} Konzentration nicht direkt mit der absoluten intrazellulären Farbstoffkonzentration zusammenhängt, die in biologischen Systemen schwer reproduzierbar ist, sondern sich aus dem Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzen berechnen lässt.

Die praktische Messung der intrazellulären thrombozytären Calciumkonzentration erfolgte mit einem Küvetten-basierten Zweikanal-Micro-Spectrofluorometer Deltascan Model 4000

der Firma Photon Technologies International. Das Licht einer Xenon-Bogenlampe wird hierbei mittels Monochromatoren der Wellenlängen 340 nm und 380 nm gefiltert und über ein fiberoptisches Kabel auf die Messküvette geleitet. Die Messküvette steht in einem Temperierblock, der eine magnetische Rührereinrichtung enthält. Das emittierte Licht wird im rechten Winkel zur Anregungsrichtung nach Passage eines Monochromators der Wellenlänge 510 nm über ein Photomultipliersystem quantifiziert. Ein System aus zum Teil rotierenden, silberbedampften Umlenk- und Fokussierspiegeln steuert hierbei den Strahlengang.

Es wurden pro Sekunde 2 Emissionsmesspaare für λ_1 und λ_2 erfasst und mit Hilfe eines PC basierenden Rechnersystems und eines Programms der o.g. Firma ausgewertet.

Die Messküvetten bestanden aus allseits transparentem optischem Suprasil-Spezial-Quarzglas der Firma Hellma und wurden vor jeder Messung sorgfältig mit Aceton, 70%igem Ethanol und mehrmals mit *Aqua bidest.* ausgespült. Vor jeder Messung wurden die Thrombozyten mit Puffer C auf eine Konzentration von 200/nl in der Küvette verdünnt und wenige Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das endgültige Volumen betrug i.d.R. 2,5 ml. Die Rührgeschwindigkeit im Temperierblock des Messsystems war stets 1000/min. Vor Aufzeichnung der Fluoreszenzwerte wurde, außer anders erwähnt, 1 mM CaCl_2 in die Küvette zugegeben. Die Zugabe von Agonisten erfolgte unter Lichtausschluss.

Zu Beginn jeder Messreihe wurden die unmarkierten Thrombozyten zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz verwendet. Diese wurde dann mittels der Software von den folgenden markierten Proben subtrahiert.

Die Kalibrierung des Mess-Systems durch Bestimmung von R_{\max} und R_{\min} unter vollständig gesättigten bzw. calciumfreien Bedingungen wurde stets nach Änderungen des Messaufbaus, wie z.B. Lampenwechsel oder Justierung des Strahlenganges, durchgeführt. Hierzu wurde eine Thrombozytenprobe mit Triton X-100 0,1% (final vol/vol) lysiert und somit das im Zytosol gespeicherte Fura-2 freigesetzt. Die folgend bestimmte Fluoreszenz entsprach R_{\max} . Nach Komplexierung der Ca^{2+} -Ionen mittels 5 mM EGTA konnte R_{\min} bestimmt werden. Die erhaltenen Eckwerte wurden anschließend in das Auswertungsprogramm eingetragen und zur Verwendung für die nachfolgenden Versuche abgespeichert. Die Werte S_{f2} und S_{b2} lassen sich durch die gemessene Fluoreszenz bei bekannter Farbstoffkonzentration (Fura 2, Pentanatriumsalz, Molecular Probes) in einer Pufferlösung unter Ca^{2+} -freien bzw. -gesättigten Bedingungen ermitteln.

4.2.10 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des thrombozytären Aktin-Zytoskeletts

Zur Darstellung der Umstrukturierungen des thrombozytären Zytoskeletts während des Gestaltwandels wurden Blutplättchen mit Rhodamin-Phalloidin angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Phalloidin ist ein Toxin aus dem Knollenblätterpilz (*Amantia phalloides*) und bindet spezifisch an filamentäres (F-) Aktin, nicht jedoch an das monomere G-Aktin. Durch Kopplung des Phalloidin an einen Fluoreszenzfarbstoff wie Rhodamin kann man diesen Vorgang sichtbar machen. Während der Aktivierung von Thrombozyten kommt es zu einer deutlichen Zunahme des filamentären F-Aktin und entsprechender Fluoreszenz entlang filamentärer Strukturen, wie z.B. Pseudopodien, die mikroskopisch beobachtet werden kann. Ruhende Zellen erscheinen eher diffus gefärbt.

Es wurden gewaschene Plättchen im o.g. LABOR Aggregometer mit Antagonisten und Agonisten bzw. Plaquematerial versetzt, eine Zellprobe in Formaldehyd-haltigem (3,7 % w/v) PBS-Puffer fixiert (Verhältnis 1:1) und anschließend auf mit poly-(L)-Lysin beschichtete Deckgläser für 5 min bei 250 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Poly-(L)-Lysin diente der besseren Haftung der fixierten Zellen. Nach dreifachem vorsichtigem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die Permeabilisierung der Thrombozyten durch Inkubation mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS-Puffer auf einem Exzentrerschüttler für 10 min bei 15 rpm und Raumtemperatur. Danach wurde dieser Puffer vorsichtig abgesaugt und dessen Reste durch insgesamt dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer auf dem Schüttler entfernt. Nun folgte die Färbung des F-Aktin durch Inkubation mit 8 U/ml (final) Rhodamin-Phalloidin (Molecular Probes) in PBS über eine Stunde bei 37 °C. Nach dreimaligem vorsichtigem Waschen mit PBS-Puffer wurde das Präparat dann mit Eindeckmedium (Immuno Fluore Mounting Medium, ICN Biochemicals Inc., Aurora, OH, USA) auf Objektträger verbracht.

Die Untersuchung der Präparate erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Typ: LSM510 META) und entsprechender Zeiss-Software.

4.2.11 Patientenauswahl

Anhand von Patienten mit manifester Atherosklerose sollten mögliche Zusammenhänge zwischen klinischer Symptomatik, kardiovaskulärem Risikoprofil, dem LPA-Gehalt der Plaques, LPA-induzierbarer Thrombozytenaktivierung sowie der durch Plaquematerial induzierbaren Aggregation untersucht werden. Hierzu wurde von Patienten der Abteilung Gefäßchirurgie des Klinikums Rechts der Isar, TU München, die sich einer Thrombendarteriektomie (TEA) der *A. carotis* unterzogen, Blut entnommen und das entfernte Plaquematerial analysiert (siehe 4.2.1) sowie klinische Daten erfasst. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der TU München (Schreiben Prof. Schömig, Vorsitzender der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät vom 09.12.98) und der LMU München (Schreiben Prof. Paumgartner, Vorsitzender der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät vom 16.05.03) gebilligt.

Die Blutentnahme erfolgte präoperativ mit 20 ml Plastik-Einmalspritzen. Zur Antikoagulation wurde Natriumcitratlösung (3,13 % w/v) im Verhältnis 1:10 des Blutvolumens vorgelegt. Unmittelbar nach Blutentnahme wurde das Blut in verschraubbare PP-Plastikgefäße überführt und eine Hälfte mit 2 mM EGTA versetzt. Der Transport erfolgte rasch zur weiteren Untersuchung. Hierbei wurde auch darauf geachtet, dass die Proben nicht unter 20°C auskühlten. Das Blut wurde dann bei 180 x g und 24°C für 20 min zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma wurde vorsichtig abpipetiert, wenige Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und dann mittels turbidometrischer Messung von Gestaltwandel und Aggregation untersucht. Da in Vorversuchen nach 2 h im PRP eine deutliche Abnahme der Antwort auf LPA beobachtet wurde, erfolgte im Hinblick auf möglichst exakte Messungen die Untersuchung des PRP innerhalb maximal 90 min nach Blutentnahme. Die oben genannte Zugabe von EGTA erfolgte, um eine Präaktivierung der Thrombozyten (*shape change*, Mikroaggregate) und den induzierbaren Gestaltwandel zuverlässig messen zu können. Das PRP wurde mit standardisierten Konzentrationen LPA, nämlich 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 und 30 µM versetzt und der induzierte *shape change* gemessen. Hieraus wurde dann ein EC50 Wert extrapoliert. Doppelmessungen waren aufgrund der eingeschränkten Menge an PRP nicht möglich. In der Hälfte des PRP, die nicht mit EGTA versetzt wurde, konnte die Spontanaggregation der Thrombozyten und die durch LPA bzw. ADP induzierbare Aggregation qualitativ beobachtet werden. Auch hierzu wurde eine standardisierte Testreihe festgelegt. Zur Dokumentation der Thrombozytenkonzentration im gewonnenen PRP erfolgte eine Quantifizierung der Thrombozytenzahl mit Hilfe einer Neugebauer-Zählkammer.

Die Erfassung der Anamnese einschließlich der klinischen Symptomatik, des kardiovaskulären Risikoprofils und laborchemischer Parameter erfolgte retrospektiv aus den Krankenakten.

4.2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel 2003 der Firma Microsoft und SPSS 12.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Die folgenden Ergebnisse sind, sofern nicht anders vermerkt, Mittelwert und Standardabweichung (SD). Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus wurde der student-t-Test für gepaarte Stichproben verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen zu synthetischen PA- und LPA-Analoga und ihre Hemmwirkung auf die LPA-induzierte Thrombozytenaktivierung

5.1.1 DGPP (8:0) hat keine agonistischen Effekte und hemmt spezifisch den LPA induzierten *shape change* von Blutplättchen

Lysophosphatidsäure (18:1) induzierte in Suspensionen gewaschener Thrombozyten in nanomolaren Konzentrationen den thrombozytären Gestaltwandel (EC_{50} von $7,4 \text{ nM} \pm 4 \text{ nM}$; $n=22$). Ein maximaler *shape change* war mit LPA-Konzentrationen von 50-100 nM erzielbar. Aggregation und Sekretion wurde in Thrombozytensuspensionen, die mit ASS und Apyrase behandelt bzw. versetzt waren, auch bei maximaler Stimulation mit LPA, nicht beobachtet.

Auf der Suche nach Substanzen, die die Wirkung von LPA auf Thrombozyten spezifisch hemmen, wurden zahlreiche PA- und LPA-Analoga, die z.T. auch natürlich vorkommen, auf ihre thrombozytäre Wirkung hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass viele Substanzen sowohl agonistische als auch antagonistische Eigenschaften hatten (siehe Tabelle 5-1).

Es konnte gezeigt werden, dass DGPP (8:0) und PA (8:0) den LPA-induzierten Gestaltwandel hemmen. Agonistische Effekte dieser Substanzen wurden nicht beobachtet. DGPP (8:0) hatte eine IC_{50} von $2,5 \pm 0,9 \text{ } \mu\text{M}$ ($n=6$) und PA (8:0) von $9,8 \pm 1,8 \text{ } \mu\text{M}$ ($n=6$). LPA (8:0) zeigte weder agonistische noch antagonistische Potenz.

Alle anderen getesteten PA- und LPA-Analoga zeigten agonistische Aktivität. Die z.T. vorhandenen antagonistischen Wirkungen waren möglicherweise durch Rezeptor-Desensibilisierung vermittelt. Einige dieser Substanzen hemmten den LPA-induzierten *shape change* zum Teil mit niedrigeren IC_{50} Werten als DGPP (8:0).

Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das, wie LPA, über G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Edg-Rezeptorfamilie zahlreiche Zellen aktiviert, zeigte auf den thrombozytären Gestaltwandel nur vergleichsweise geringe Effekte ($EC_{50} = 17 \pm 10 \text{ } \mu\text{M}$). Der durch S1P induzierbare *shape change* wurde durch vorherige Gabe von LPA (100 nM) desensibilisiert und durch Vorinkubation mit DGPP (10 μM) oder NASerPA (2 mM) nahezu vollständig gehemmt.

Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass S1P als strukturell verwandtes Lipid seine Wirkungen als schwacher Agonist über die Aktivierung von LPA-Rezeptoren entfaltet.

Tabelle 5-1:

Phospholipid	EC ₁₀₀ / max. zugegebene Konz. (µM)	% des max s.c.*	EC ₅₀ (µM)	SD	IC ₅₀ (µM)	SD	n
acyl-LPA (18:1)	0,05	100	0,007	± 0,004			22
acyl-LPA (16:0)	0,05	100	0,007	± 0,005			5
alkyl-LPA (16:0)	0,025	100	0,0009	± 0,0001			3
acyl-LPA (20:4)	0,025	100	0,0025	± 0,0009			3
acyl-LPA (8:0)	20	20	0		0		3
DGPP (8:0)	100	0	0		2,5 ± 0,9		6
DGPP (18:1)	50	0	0		>50		3
LPPA (17:0)	100	0	>50		>50		2
MAGDP (18:0)	2,5	100	0,8	± 0,22	0,42 ± 0,2		5
PA (8:0)	50	0	0		9,8 ± 1,8		6
PA (18:1)	2,5-12	100	1,8	± 0,7	2,6 ± 2		4
PA (18:0)	0,5-2	90	0,56	± 0,34	0,43 ± 0,26		4
cPA (18:1)	1	100	0,27	± 0,07	0,7 ± 0,6		4
NPTyrPA	2,5	90	0,25	± 0,07	0,32 ± 0,22		5
NPSerPA	0,5	100	0,15		0,2		2
S1P	30-50	50-90	17	± 10	12 ± 6		4

Effekt von LPA- und PA-Analoga auf Induktion und Inhibition des thrombozytären *shape change*. Der durch 0,1 µM LPA induzierte *shape change* wurde als 100 % Wert definiert. Die Ergebnisse sind Mittelwert ± SD aus n Experimenten mit Thrombozyten von verschiedenen Probanden. **shape change*.

Um eine unspezifische Hemmung des LPA induzierten Gestaltwandels durch DGPP (8:0) bzw. PA (8:0) auszuschließen, wurden verschiedene weitere Thrombozyten aktivierende Substanzen mit diesen Antagonisten getestet. Es zeigte sich, dass eine spezifische Hemmung des LPA induzierten *shape change* durch DGPP (8:0) und PA (8:0) vorlag. Die agonistischen Effekte von PAF, dem Thromboxan Rezeptor Agonist U44619, ADP, Thrombin, und den Thrombin-Rezeptor aktivierenden Peptiden SFLLRNP bzw. YFLLRNP wurden durch DGPP (8:0) nicht signifikant beeinflusst (siehe Abb. 5-1).

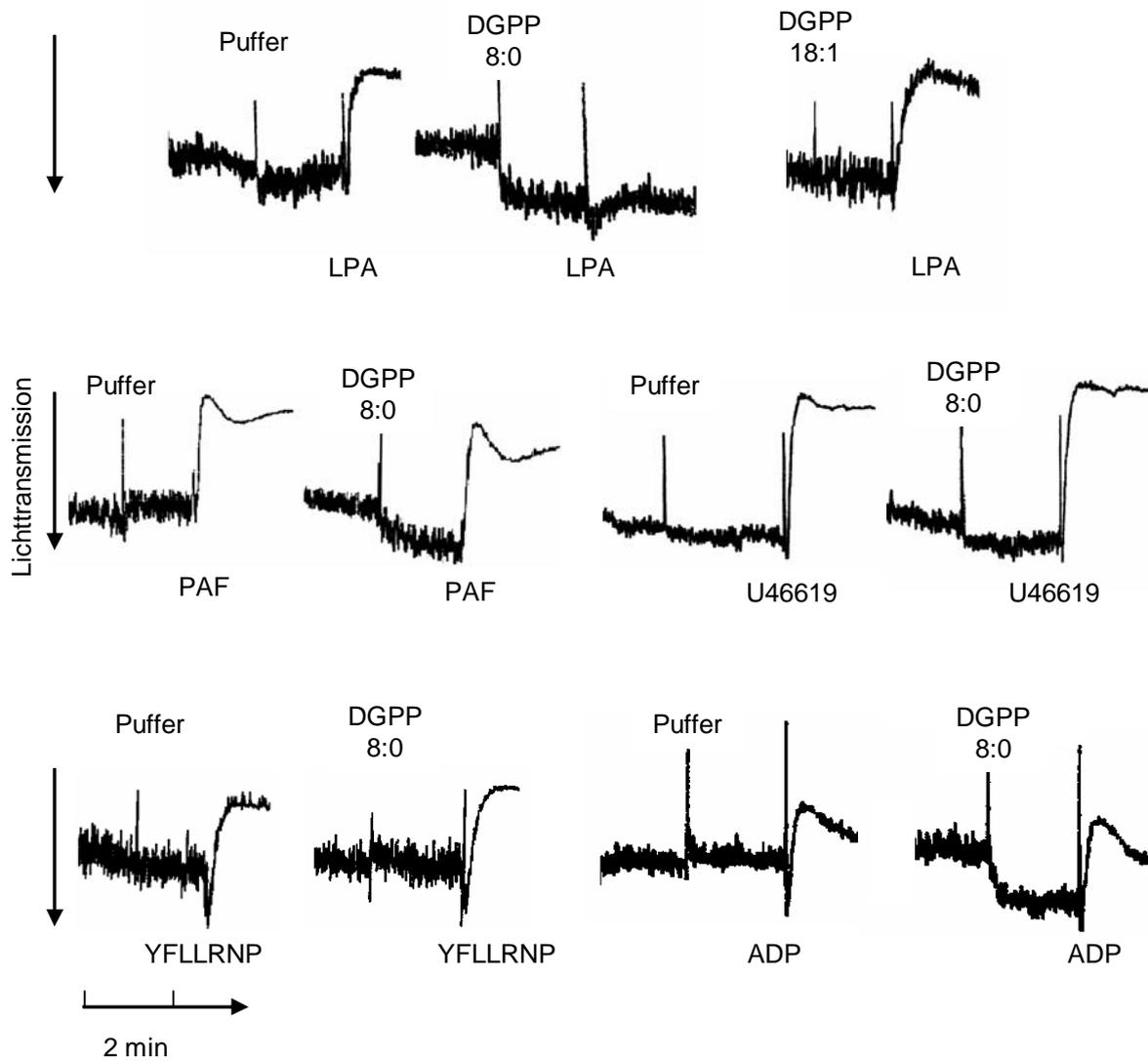


Abbildung 5-1: DGPP (8:0), nicht jedoch DGPP (18:1), hemmt spezifisch den, durch LPA induzierten *shape change*. Suspensionen von gewaschenen Plättchen wurden entweder mit dem Lösungsmittel oder 10 μM DGPP (8:0) bzw. DGPP (18:1) für 2 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von LPA (100 nM), PAF (100 nM), U46619 (100 nM), YFLLRNP (300 M) und ADP (0,5 μM). *Shape change* wurde als Abnahme der Lichttransmission gemessen. Die gezeigten Kurven sind repräsentativ für n=5 Experimente.

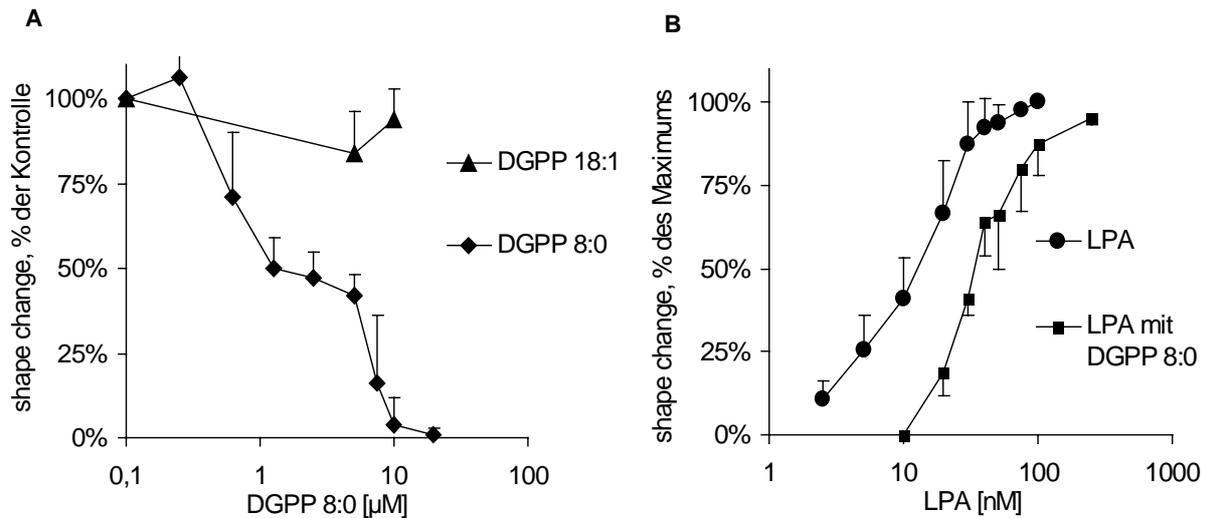


Abbildung 5-2: (A) DGPP (8:0) hemmt dosisabhängig den, durch LPA induzierten *shape change*. Gewaschene Thrombozyten wurden entweder mit dem Lösungsmittel oder verschiedenen Konzentrationen von DGPP (8:0) bzw. DGPP (18:1) für 10 min inkubiert. Dann wurde LPA (100 nM) hinzugegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=7$.

(B) Die Hemmung des LPA-induzierten *shape change* durch DGPP (8:0) unterliegt einem kompetitiven Mechanismus. Thrombozyten wurden mit DGPP (8:0) (2,5 μ M) oder Lösungsmittel für 2 Minuten inkubiert vor Exposition von verschiedenen LPA-Konzentrationen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD, $n=3$.

Die Hemmwirkung von DGPP (8:0) wurde im Detail näher untersucht. DGPP (18:1) mit langkettigen Fettsäureresten hatte keinen Effekt auf den LPA induzierten *shape change* (siehe Abb. 5-1). Der hemmende Effekt von DGPP (8:0) war dosisabhängig. Die Inkubation von Thrombozyten mit 2,5 μ M DGPP (8:0), einer Konzentration, die etwa dem IC_{50} -Wert entspricht, verschob die Dosis-Wirkungs-Kurve für LPA etwa um den Faktor 3 nach rechts (siehe Abb. 5-2). Außerdem wurde beobachtet, dass die inhibitorische Wirkung von DGPP (8:0) mit der Inkubationszeit zunahm. Nach 5 min wurde die maximale Hemmung mit 10 μ M DGPP (8:0) erreicht (siehe Abb 5-3).

Mittels Auswaschexperimenten wurde gezeigt, dass der inhibitorische Effekt von DGPP (8:0) komplett reversibel war. Durch Verdünnung der mit DGPP (8:0) inkubierten Thrombozyten mit Puffer C (Verhältnis 1:10), Pelletierung und Resuspension in Puffer C konnte die Hemmung des LPA induzierten *shape change* vollständig aufgehoben werden. Eine irreversible Veränderung des Rezeptors oder intrazelluläre Wirkung von DGPP (8:0) konnte somit ausgeschlossen werden. Um eine strukturelle Veränderung des zugesetzten DGPP (8:0) während der benötigten Inkubationszeit zu möglicherweise aktiven Metaboliten, wie PA (8:0), DAG (8:0) oder LPA (8:0) auszuschließen, untersuchten wir diese verwandten

Moleküle auf ihre LPA-antagonistische Wirkung. PA (8:0) zeigte ebenfalls antagonistische Wirkungen, jedoch mit einer deutlich höheren IC_{50} (siehe Tabelle 5-1). Die Inkubation von Thrombozyten mit Diacylglycerol (8:0) ($10 \mu\text{M}$) führte zu einer unspezifischen Inhibierung der Plättchenaktivierung und führte nach ca. 10 min zum Eintreten von Aggregation ($n=3$). LPA (8:0) hatte weder agonistische, noch antagonistische Effekte. Eine Metabolisierung von DGPP (8:0) zu einem anderen LPA-Antagonisten konnte somit ausgeschlossen werden. Weshalb jedoch eine vergleichsweise lange Inkubationszeit der Thrombozyten mit DGPP (8:0) bis zur vollen Entfaltung der LPA-hemmenden Wirkungen notwendig war, bleibt letztlich unklar.

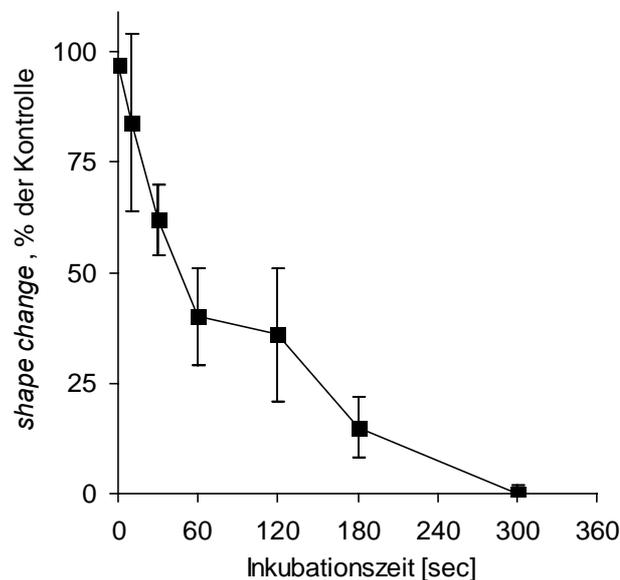


Abbildung 5-3: Die inhibitorische Wirkung von DGPP (8:0) nimmt mit der Inkubationszeit zu. Gewaschene Thrombozyten wurden mit $10 \mu\text{M}$ DGPP (8:0) versetzt und unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Thrombozytensuspensionen mit 1200 Umdrehungen/min in der Messeinrichtung gerührt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD ($n=3$).

5.1.2 DGPP (8:0) hemmt die Erhöhung des zytosolischen Calcium durch LPA

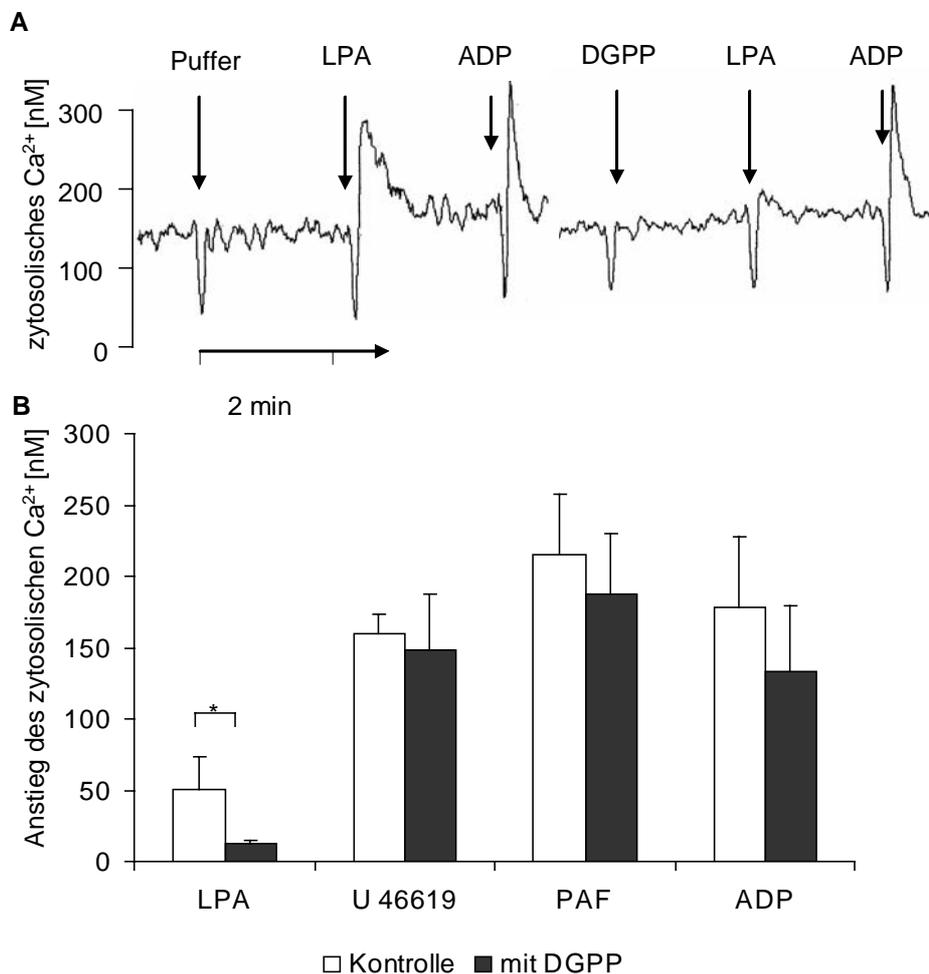


Abbildung 5-4: DGPP (8:0) hemmt den LPA induzierten zytosolischen Ca^{2+} Anstieg in Thrombozyten. Gewaschene Thrombozyten wurden mit Fura-2 AM beladen und der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel mittels Fluorometrie gemessen. Suspensionen dieser Blutplättchen wurden bei 37°C gerührt und entweder mit dem Lösungsmittel oder 10 μM DGPP (8:0) für 2 Minuten inkubiert. (A) Die Pfeile zeigen, wie beschriftet, die Zugabe von LPA (10 μM) und ADP (1 μM). Die gezeigte Kurve ist repräsentativ für 6 Experimente. (B) Das Balkendiagramm zeigt den Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Zugabe von LPA (10 μM), U46619 (100 nM), PAF (20 nM) und ADP (1 μM). Die Werte sind Mittelwerte \pm SD, n= 4-6. *p < 0,01 für Kontrolle vs DGPP (8:0).

Der Anstieg des zytosolischen Calciums ist ein wesentlicher Prozess bei der Aktivierung von Zellen. Hohe Konzentrationen an LPA (>1 μM , EC_{50} = 5 μM) induzieren eine geringe Zunahme des zytosolischen Ca^{2+} in Thrombozyten, v.a. durch Stimulation des Ca^{2+} -Einstroms¹⁰⁴. DGPP (8:0) hemmte spezifisch den durch LPA induzierten Anstieg des zytosolischen Calciums um $80 \pm 5\%$ (Mittelwert \pm SD, n = 4), nicht jedoch die Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach U46619, PAF oder ADP (siehe Abb. 5-4).

5.1.3 DGPP (8:0) hemmt die LPA-induzierte Aggregation von Blutplättchen

Shape change, als erster Schritt der Aktivierung von Blutplättchen und Ca^{2+} -Mobilisation sind schnelle zelluläre Antworten, die bei ausreichend starker Stimulation zur folgenden Aggregation von Thrombozyten führen. LPA induzierte in einer Suspension gewaschener Thrombozyten, die mit ASS inkubiert und mit Apyrase versetzt worden waren, jedoch nur *shape change* und Ca^{2+} Mobilisation, aber keine Aggregation. Mittels einer speziellen Methode zur Thrombozytenpräparation, die auf ASS und Apyrase verzichtet⁶⁹ (*Gueguen-Methode*), konnten Plättchensuspensionen hergestellt werden, welche auf niedrige LPA-Konzentrationen mit *shape change* und auf höhere LPA-Konzentrationen mit Aggregation reagierten. Vor allem durch den fehlenden Abbau von ADP war der Umgang mit diesen Plättchensuspensionen jedoch schwierig. Durch Abnahme der Sensitivität der Thrombozyten waren die Ergebnisse nur innerhalb der ersten 60 min vergleichbar. In 2 von 5 Experimenten waren die Thrombozyten voraktiviert, sichtbar an fehlender Basaloszillation und nicht mehr auslösbarem *shape change*. *Shape change* war nur in 3 von 5 Experimenten bei ähnlichen LPA Konzentrationen, wie oben für die Standard-Präparation beschrieben, auslösbar.

Aggregation wurde beginnend ab einer Konzentration von 250 nM beobachtet. Die EC_{50} lag bei $0,5 \pm 0,21 \mu\text{M}$ ($n=5$). 1 μM LPA induzierte in $n = 5$ Experimenten eine irreversible Aggregation. Diesbezüglich konnte eine dosisabhängige Hemmung durch DGPP (8:0) nachgewiesen (IC_{50} $4,1 \pm 2,8 \mu\text{M}$, $n=3$, siehe Abb. 5-5) werden. Untersuchungen zur Spezifität der beobachteten Inhibierung ergaben, dass hohe Konzentrationen an DGPP 8:0 (50 μM) auch die Aggregation durch U46619 (250 nM, Hemmung um 34 %), ADP (10 μM , Hemmung um 30 %), PAF (100 μM , Hemmung um 41 %) und Kollagen (2,5 $\mu\text{g/ml}$, Hemmung um 28 %), nicht aber Thrombin (0,2 U/ml) beeinflussten ($n = 2$). Bis zu Konzentrationen von 20 μM DGPP (8:0) wurde nur die Aggregation durch LPA signifikant gehemmt. Der initiale *shape change* durch die genannten Agonisten wurde durch DGPP 8:0 auch in hohen Konzentrationen (50 μM) nicht beeinflusst.

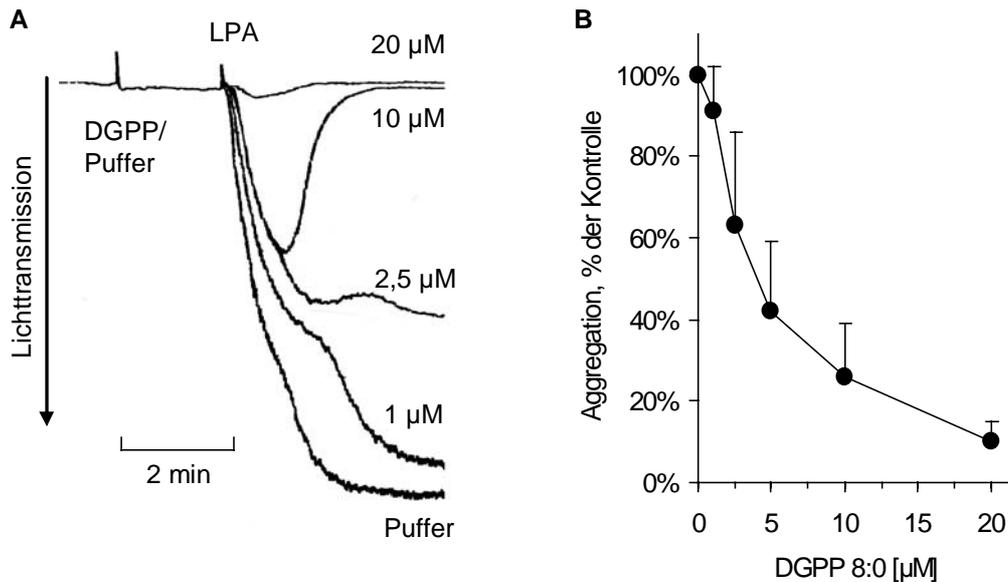


Abbildung 5-5: DGPP hemmt die LPA-induzierte Thrombozytenaggregation. (A) Gewaschene Blutplättchen, hergestellt nach einem Protokoll von Gueguen et al.⁶⁹, wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen DGPP (8:0) oder Puffer versetzt. Nach 2 Minuten erfolgte die Zugabe von 1 µM LPA. (A) Gezeigt sind Aggregationskurven, repräsentativ für n=5 Experimente. Die aufgeführten Konzentrationen entsprechen der zugesetzten Menge DGPP (8:0) bzw. der maximalen Lösungsmittelmenge (Puffer). (B) Dosis-Wirkungs-Kurve für die Hemmung der LPA - (1 µM) - induzierten Thrombozytenaggregation durch DGPP (8:0). Die Werte sind Mittelwerte ± SD, n=5.

5.2 Untersuchungen zur Bedeutung von LPA bei der Thrombozytenaktivierung durch Plaquematerial

5.2.1 DGPP (8:0) hemmt den *shape change*, induziert durch mox-LDL und den Lipidkern (*lipid-rich core*) atherosklerotischer Plaques

Ergänzend zu früheren Beobachtungen, dass LPA ein wichtiges Thrombozyten-aktivierendes Lipid in mox-LDL ist¹⁵³, konnte gezeigt werden, dass Vorinkubation der Plättchen mit DGPP (8:0) den *shape change* durch mox-LDL hemmte. Des Weiteren hemmt DGPP (8:0) vollständig den Gestaltwandel der Thrombozyten durch Lipidextrakte aus atherosklerotischen Läsionen von Patienten mit Karotisstenose (siehe Abb 5-6). MAGDP hemmte ebenfalls den thrombozytären *shape change* durch Lipidextrakte aus Carotisplaques (Daten nicht gezeigt).

Die Extrakte aus dem *lipid-rich core* atherosklerotischer Plaques wurden analog den beiden beschriebenen Methoden der Lipidisolierung hergestellt (vgl. 4.2.2). Beide Extraktionsmethoden trennen v.a. Phospholipide von dem übrigen Plaquematerial. Um zu untersuchen, ob in diesen Extrakten neben LPA noch andere Thrombozyten-aktivierende oder -hemmende Substanzen enthalten sind, erfolgte eine weitere Auftrennung mittels

Dünnschichtchromatographie. Die durch ^3H -LPA markierte Kieselgelbande wurde abgekratzt und LPA wurde eluiert. In den übrigen Bereichen der Chromatographie-Laufspur fanden sich nach Elution des Kieselgels keine Substanzen mit nennenswerter Aktivierung der Thrombozyten (Daten nicht gezeigt, siehe auch Siess et al.¹⁵³). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Wiederfindungsrate von ^3H -markiertem LPA fand sich in den Extrakten eine biologisch gemessene LPA-Konzentration von $83 \pm 7\%$ (Standard-Methode) bzw. $75 \pm 40\%$ (Baker/Tigyi-Methode, je $n=3$) im Vergleich zur LPA-Konzentration nach Dünnschichtchromatographie, die als 100 %-Wert definiert wurde. Es lässt sich daher folgern, dass LPA einerseits das wichtigste Thrombozyten aktivierende Lipid aus mox-LDL und dem Lipidkern atherosklerotischer Läsionen darstellt und andererseits keine wesentlichen Hemmsubstanzen im Lipidextrakt vorhanden sind.

Es konnte des Weiteren zum ersten Mal gezeigt werden, dass der herausgelöste und homogenisierte Lipidkern aus menschlichen Carotisplaques direkt, d.h. ohne vorhergehende Lipidextraktion, gewaschene Thrombozyten stimuliert. Lipidkerne aus 7 von 12 getesteten Carotisplaques induzierten den Gestaltwandel in Suspensionen gewaschener Thrombozyten. Dieser initiale Schritt der Aktivierung von Blutplättchen konnte durch Vorinkubation mit DGPP (8:0) nahezu vollständig gehemmt werden. Die nachfolgende Zugabe von LPA blieb, wie erwartet, ohne Antwort. Als Kontrolle ergab die Stimulation mit ADP einen deutlichen Gestaltwandel. Nach Vorinkubation der Thrombozyten mit dem LPA-Rezeptor Antagonist NAserPA konnte ebenfalls eine Hemmung des *shape change* gefunden werden (siehe Abb. 5-6).

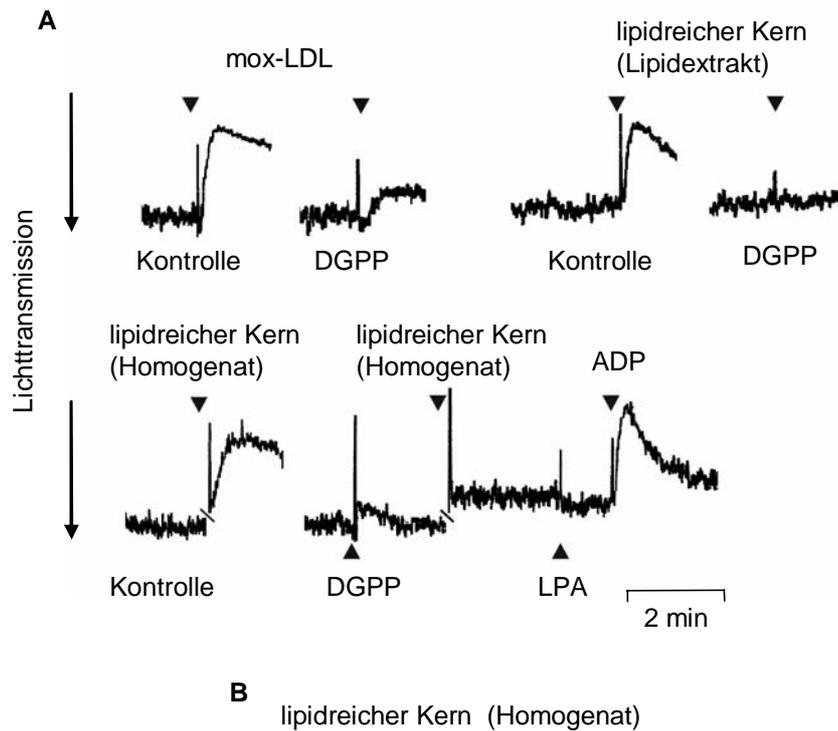


Abbildung 5-6: DGPP (8:0) hemmt den thrombozytären *shape change*, induziert durch mox-
LDL und lipidreiche Plaquekerne. (A) *shape change* Kurven. Oben: Thrombozyten wurden
mit Albumin-Puffer (Kontrolle) oder 5 μM DGPP (8:0) für 10 min inkubiert und dann mit mox-
LDL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Lipidextrakt aus dem Lipidkern eines humanen Plaques (1 mg
Plaques/ml) versetzt. Die Kurven sind repräsentativ für 7 Experimente. Unten: Thrombozyten
wurden mit 20 μM DGPP (8:0) für 2 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von Homogenat
des lipidreichen Plaquekernes (1 mg/ml) und anschließend LPA und ADP. (B)
Zusammenstellung der Ergebnisse von Experimenten mit homogenisierten lipidreichen
Plaquekernen: Thrombozyten wurden mit Puffer bzw. 0,2 % Ethanol (Kontrolle), 20 μM
DGPP (8:0) oder 2 μM NPSerPA für 7 min inkubiert bevor homogenisierte lipidreiche
Plaquekerne (0,5-1 mg/ml) aus Operationspräparaten von 7 Patienten mit Carotisstenosen
hinzugegeben wurden. *Shape change* wurde als prozentualer Anteil des maximalen *shape
change*, induziert durch 100 nM LPA bzw. 1 μM ADP angegeben. Die Messungen wurde 2-
bis 7-fach an Thrombozyten verschiedener Blutspender durchgeführt. Die Werte sind
Mittelwert \pm SD (n=7 Plaques).

Die morphologische Untersuchung von F-Aktin angefärbten Thrombozyten bestätigte diese Beobachtung und zeigte direkt den durch den *lipid-rich core* induzierten *shape change*. Die Zugabe dieses Materials des führte zu ähnlichen Zytoskelettveränderungen wie LPA, nämlich Sphärisierung der Zellen, Membraninvagination und Ausbildung von Pseudopodien. Die Vorinkubation mit DGPP (8:0) verhinderte diesen Gestaltwandel fast komplett, erkennbar dadurch, dass 90 % der Zellen ihren diskoiden Ausgangszustand beibehielten (siehe Abb. 5-7).

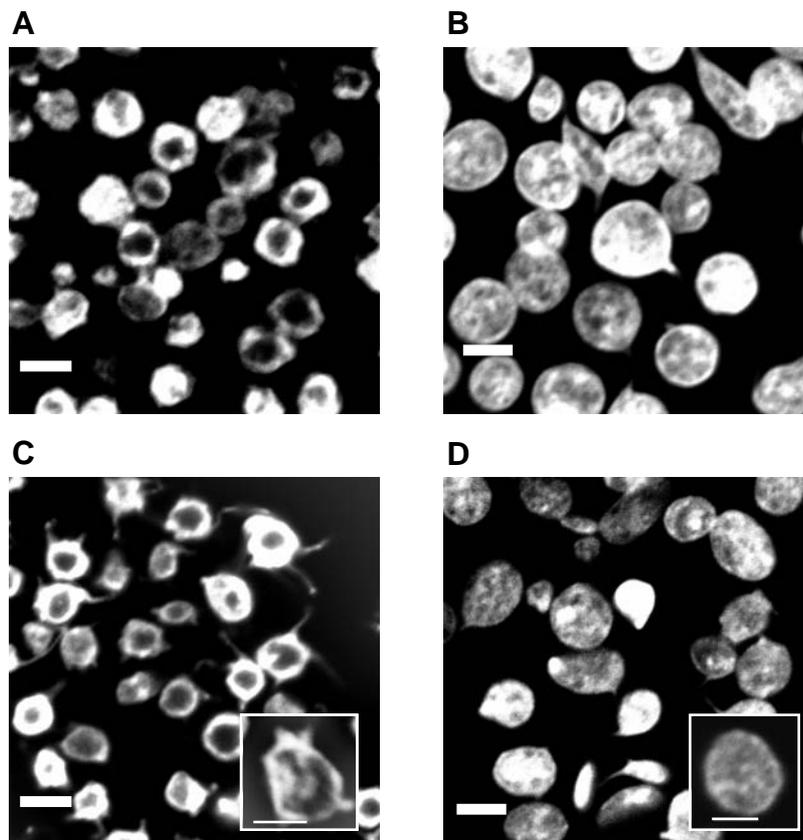


Abbildung 5-7: DGPP (8:0) hemmt den morphologischen *shape change* humaner Thrombozyten durch LPA und den lipidreichen Plaquekern. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Phalloidin-gefärbten Thrombozyten. Gewaschene humane Thrombozyten wurden für 5 min mit Puffer oder DGPP (8:0) inkubiert und dann mit LPA oder Plaquekernmaterial versetzt. Nach 30 sec erfolgte die Fixierung und anschließende Anfärbung der Thrombozyten mittels Rhodamin-gekoppeltem Phalloidin. (A) Acyl-LPA (16:0, 25 nM), (B) DGPP (8:0, 20 μ M) plus acyl-LPA, (C) lipidreicher Plaquekern (1 mg/ml), (D) DGPP (8:0, 20 μ M) plus lipidreichen Plaquekern. In A und C sind als Ausdruck der Thrombozytenaktivierung die Aktinkondensation (Abnahme der Größe, Anstieg der Fluoreszenz) sowie die Ausbildung von Pseudopodien deutlich zu erkennen. Der Balken entspricht 2 μ m (Vergrößerung 1000-fach).

Diese Ergebnisse zeigen, dass LPA aus dem vulnerablen Lipidkern atherosklerotischer Läsionen rasch den thrombozytären Gestaltwandel induziert und dass diese Aktivierung sehr effizient durch den LPA₁ und LPA₃ Rezeptorantagonisten DGPP (8:0) blockiert werden kann.

5.2.2 Quantitative LC-MS Analyse und Vergleich der biologischen Aktivität der molekularen LPA-Spezies in atherosklerotischen Läsionen

Um die einzelnen molekularen LPA-Spezies in Atherosklerose-Plaques zu charakterisieren, wurde eine Lipidanalyse mittels ESI LC-MS durchgeführt. Baker et al.¹⁴ zeigten, dass mit dieser Methode genau und sensitiv die individuellen LPA-Spezies in Plasma und Serum bestimmt werden können.

Es wurde Plaquematerial von 28 Patienten, die sich einer Thrombendarteriektomie der *A. carotis* unterzogen verwendet. Die Operationspräparate wurden, wie beschrieben, in die verschiedenen Plaqueregionen (normale Intima, Plaque-Schulter, Plaque-Kern, diffuse Intimaverdickung) zerlegt, gewogen und bei -80 °C gelagert. Diese atheromatösen Plaqueanteile wurden dann mechanisch homogenisiert. Im Unterschied zum vorsichtigen Herauslösen des Lipidkerns, enthielten die Homogenate der Region Plaque-Kern auch die (den eigentlichen Lipidkern) umgebenden faserigen und z.T. verkalkten Anteile des Operationspräparates. Die Lipide wurden nach der Methode von Baker et al.¹⁴ extrahiert. Aus den Lipidextrakten wurde dann einerseits biologisch, über die Messung des thrombozytären Gestaltwandels (Bioassay) und andererseits quantitativ mittels ESI-LC-MS der LPA-Gehalt der Lipidextrakte bestimmt.

Die LC-MS Analyse ergab, dass die Region Plaque-Kern etwa 64 % acyl-LPA und 36 % alkyl-LPA enthielten. Entsprechend der LC-MS Analyse enthielten die Regionen Plaque-Kern $14,5 \pm 6,6$ pmol/mg Feuchtgewicht Gesamt-LPA. Der Mittelwert an acyl-LPA war $9,2 \pm 5,6$ pmol/mg Feuchtgewicht und der an alkyl-LPA $5,3 \pm 2,7$ pmol/mg Feuchtgewicht (alle Werte Mittelwerte \pm SD, n=28 Plaques, siehe Tabelle 5-2). Die prozentualen Verteilungen der jeweiligen molekularen LPA-Spezies sind in Abb. 5-8 und in den Tabellen 5-3 und 5-4 dargestellt.

Tabelle 5-2:

Nr.	<i>Bioassay</i>	acyl-LPA	alkyl-LPA	gesamt LPA
1	20,3 ± 17,9	5,0	3,4	8,5
2	-	7,4	4,4	11,7
3	30,1 ± 11,2	8,6	3,8	12,4
4	8 ± 2,4	2,0	1,6	3,6
5	-	21,4	6,9	28,3
6	-	2,7	2,6	5,3
7	-	4,2	3,6	7,8
8	-	4,3	4,6	8,9
9	-	6,7	4,1	10,8
10	63,4 ± 72,2	14,2	5,8	19,9
11	28,6 ± 13,7	5,5	2,7	8,2
12	32 ± 7	9,5	5,3	14,7
13	55,4 ± 36,7	7,9	8,9	16,8
14	11,5 ± 10,6	12,7	10,8	23,5
15	16,3 ± 6,7	4,4	7,1	11,5
16	7,3 ± 4,2	6,1	7,5	13,6
17	62 ± 29,2	9,1	12,7	21,7
18	28,7 ± 7,8	5,1	5,5	10,7
19	17,3 ± 8,6	3,3	4,9	8,2
20	50,6 ± 46,9	8,8	7,4	16,1
21	69,4 ± 23,5	6,8	8,0	14,8
22	68,7 ± 38,1	14,6	5,7	20,3
23	32,4 ± 10	21,8	5,0	26,8
24	46 ± 21	16,2	3,3	19,5
25	29,4 ± 12	6,2	1,6	7,8
26	24 ± 10,6	10,5	2,6	13,1
27	12,5 ± 0,7	19,9	4,8	24,7
28	18,3 ± 4,2	13,5	2,7	16,2
MW ± SD	33,3 ± 20,4	9,2 ± 5,6	5,3 ± 2,7	14,5 ± 6,6

LPA-Gehalt von Plaques von 28 Patienten mit Carotisstenose. Die Homogenate der Region Plaque-Kern wurden, wie beschrieben, mittels *Bioassay* an Thrombozyten oder LC-MS auf ihren LPA-Gehalt untersucht. Die Werte des Bioassays sind Mittelwerte ± SD. Es wurden jeweils Doppelmessungen an gewaschenen Thrombozyten von n=3 Probanden durchgeführt. Die LC-MS-Werte sind Einfachwerte.

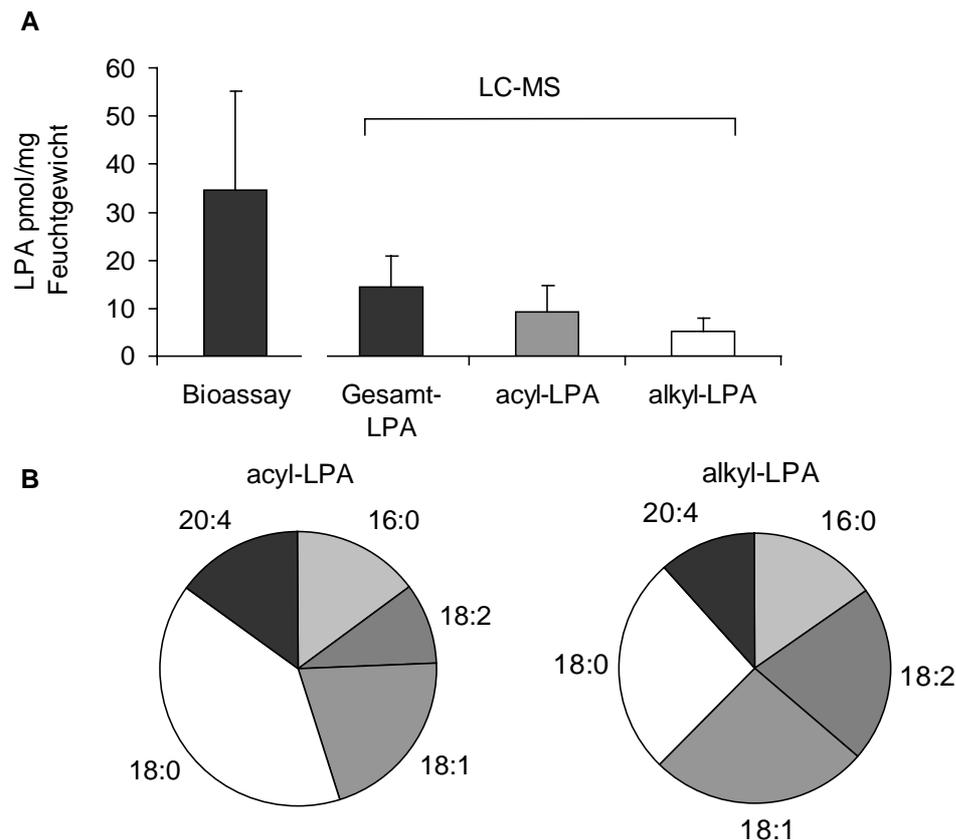


Abbildung 5-8: Identifikation verschiedener LPA-Spezies in humanen atherosklerotischen Plaques. (A) LPA wurde aus Region Plaque-Kern atherosklerotischer Plaques extrahiert und mittels Bioassay anhand *shape change* Bestimmung (n=22 von 28 Plaques) und mittels LC-MS quantifiziert (n=28 Plaques). Die Werte sind Mittelwerte \pm SD. (B) Die Tortendiagramme zeigen die prozentuale Verteilung der einzelnen Fettsäurereste innerhalb der alkyl- und der acyl-LPA Untergruppe (n=28 Plaques).

Die Analyse der einzelnen Plaques ergab, dass sich die Fettsäurereste in der acyl-LPA-Gruppe wie folgt verteilen: 18:2 (10%) < 16:0 (15%) = 20:4 (15%) < 18:1 (20%) < 18:0 (40%). In der alkyl-Gruppe ergab sich folgendes Verhältnis der Fettsäurereste: 20:4 (12%) < 16:0 (15%) < 18:2 (21%) < 18:1 (26%) = 18:0 (26%). Alkyl-LPA enthielt prozentual mehr LPA-Spezies mit 18:2- und 18:1- und weniger 18:0-Fettsäureresten als acyl-LPA (siehe Abb. 5-8). Bezüglich der Standardabweichung dieser Verteilung siehe Tabelle 5-3 und 5-4. In der acyl-LPA-Gruppe dominierte das gesättigte LPA (18:0). In der alkyl-Gruppe verteilen sich die einzelnen alkyl-LPA-Spezies relativ gleichmässig. Es wurde eine umfangreiche statistische Analyse der Absolutmengen und der relativen Anteile der einzelnen LPA-Spezies mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS 12.0 durchgeführt. Einzelne Patienten oder Patientengruppen mit besonderer Zusammensetzung der LPA-Spezies, die z.B. nutritiv bedingt sein könnte, konnten aus der untersuchten Stichprobe nicht identifiziert werden. In der acyl-LPA Gruppe war die große Breite der Verteilung des prozentualen Anteils von acyl-(18:0)-LPA am gesamten acyl-LPA auffällig (19% - 72%).

Tabelle 5-3:

Nr.	acyl-LPA (rel. %)				
	16:0	18:2	18:1	18:0	20:4
1	12%	7%	10%	64%	7%
2	9%	8%		65%	12%
3	12%	7%	20%	53%	8%
4	22%	11%	14%	35%	17%
5	22%	12%	22%	38%	5%
6	37%	12%	21%	20%	10%
7	23%	14%	19%	25%	18%
8	8%	10%	23%	36%	23%
9	35%	9%	15%	21%	20%
10	10%	9%	29%	43%	9%
11	10%	8%	20%	43%	19%
12	9%	8%	31%	33%	19%
13	19%	17%	18%	27%	19%
14	10%	11%	25%	40%	14%
15	13%	12%	19%	45%	12%
16	10%	9%	26%	27%	29%
17	17%	16%	25%	25%	16%
18	16%	6%	17%	36%	24%
19	20%	8%	12%	31%	30%
20	5%	11%	32%	29%	23%
21	27%	12%	17%	22%	21%
22	14%	18%	27%	19%	22%
23	12%	6%	20%	50%	12%
24	7%	3%	9%	69%	13%
25	14%	6%	23%	50%	6%
26	9%	4%	9%	72%	6%
27	12%	8%	23%	52%	5%
28	9%	7%	25%	55%	5%
MW	15%	10%	20%	40%	15%
SD	8%	4%	6%	15%	7%

Relativer Anteil der unterschiedlichen acyl-Fettsäurereste am Gesamt-acyl-LPA-Gehalt der untersuchten Plaques. Die Werte sind jeweils Einzelmessungen (LC-MS), wie beschrieben. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Fettsäurereste der acyl-Untergruppe ist als Mittelwert \pm SD (n=28 Plaques) am Ende der Tabelle ausgewiesen.

Tabelle 5-4:

Nr.	alkyl-LPA (rel. %)				
	16:0	18:2	18:1	18:0	20:4
1	13%	18%	24%	39%	6%
2	12%	21%	18%	39%	11%
3	14%	32%	20%	23%	12%
4	12%	16%	19%	33%	20%
5	10%	48%	24%	14%	4%
6	13%	16%	14%	43%	14%
7	21%	20%	25%	24%	10%
8	13%	33%	21%	25%	7%
9	26%	17%	21%	28%	8%
10	17%	26%	28%	20%	8%
11	6%	25%	15%	44%	9%
12	4%	41%	13%	30%	13%
13	37%	25%	17%	22%	0%
14	7%	31%	27%	16%	19%
15	2%	7%	28%	21%	42%
16	3%	19%	22%	35%	21%
17	8%	39%	20%	10%	23%
18	4%	14%	24%	21%	38%
19	3%	3%	29%	34%	30%
20	7%	36%	20%	28%	8%
21	22%	3%	45%	16%	15%
22	31%	34%	0%	35%	0%
23	30%	5%	49%	19%	0%
24	31%	5%	44%	19%	0%
25	15%	4%	46%	38%	0%
26	17%	17%	46%	20%	0%
27	10%	30%	28%	23%	10%
28	42%	11%	31%	14%	0%
MW	15%	21%	26%	26%	12%
SD	11%	13%	11%	9%	11%

Relativer Anteil der unterschiedlichen alkyl-Fettsäurereste am Gesamt-alkyl-LPA-Gehalt der untersuchten Plaques. Die Werte sind jeweils Einzelmessungen (LC-MS), wie beschrieben. Die prozentuale Verteilung der einzelnen Fettsäurereste der alkyl-Untergruppe ist als Mittelwert \pm SD (n=28 Plaques) am Ende der Tabelle ausgewiesen.

Für die Messung der biologischen Aktivität der LPA-Extrakte aus den Plaques wurden Thrombozyten der Standardpräparation verwendet und der Gestaltwandel gemessen (Bioassay). Anhand einer Eichkurve bekannter Konzentrationen von oleoyl-LPA und Titrierung der Lipidextrakte konnte so die LPA-Konzentration der Extrakte extrapoliert werden. Sämtliche Messungen erfolgten zumindest doppelt und an Blutplättchen von drei verschiedenen Probanden. Zur Berechnung des LPA-Gehaltes des ursprünglichen Plaquepräparates wurde die *recovery*, d.h. die verbliebene Menge des Tritium-markierten LPAs nach dem Extraktionsprozess berücksichtigt. Die *recovery* lag im Durchschnitt bei $68 \pm$

17 % (n=22). Der im Bioassay ermittelte LPA-Gehalt der Region Plaque-Kern lag bei $33,3 \pm 20,4$ pmol/mg Feuchtgewicht (n=22) und somit deutlich über den Werten der biophysikalischen LC-MS Messungen (siehe Abb 5-8 und Tabelle 5-2). Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch unterschiedliche biologische Potenz verschiedener molekularer LPA-Spezies erklären. Es wurde gefunden, dass alkyl-LPA (16:0) und acyl-LPA (20:4) 18mal bzw. 6,5mal so aktiv waren bezüglich der Induktion des thrombozytären Gestaltwandels wie acyl-LPA (16:0). Diese besonders potenten LPA-Spezies, die 36 % der Gesamt-LPA-Menge (alkyl-LPA) bzw. 15% von acyl-LPA (acyl-20:4-LPA) betragen, scheinen daher wesentlich zur Thrombozytenaktivierung durch Plaquematerial beizutragen (siehe Abb. 5-9). Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen hohem Gehalt an alkyl-LPA bzw. acyl-(20:4)-LPA und hohen LPA-Werten im Bioassay konnte allerdings in den einzelnen Plaueproben nicht nachgewiesen werden.

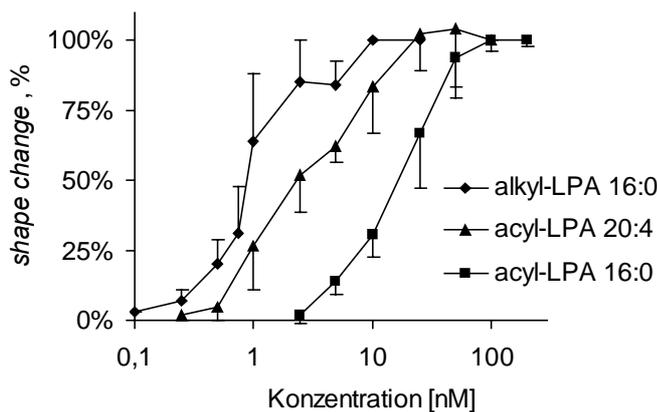


Abbildung 5-9: Biologische Aktivität verschiedener LPA-Spezies, die in atherosklerotischen Plaques vorkommen. Dosis-Wirkungs-Kurve für thrombozytären *shape change*, induziert durch alkyl-LPA (16:0), acyl-LPA (20:4) und acyl-LPA (16:0). Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=3).

5.2.3 Synergistische Induktion von Thrombozytenaggregation durch LPA und den Lipidkern atherosklerotischer Läsionen mit unterschwelligen Konzentrationen von ADP und Adrenalin: Hemmung durch DGPP (8:0)

Dem Gestaltwandel als ersten Schritt der Thrombozytenaktivierung folgt Aggregation und *in vivo* konsekutive Thrombusbildung mit Verschluss des betroffenen Gefäßes. LPA induziert in Thrombozytensuspensionen, die mit ASS und Apyrase vorbehandelt bzw. versetzt wurden, alleine keine Aggregation. Um zu untersuchen ob LPA oder Plaquematerial zusammen mit

geringen Konzentrationen eines weiteren Agonisten eine Aggregation hervorruft, wurden Plättchensuspensionen, die eine geringe Menge Fibrinogen enthielten mit LPA und niedrigen Konzentrationen ADP, die alleine nur *shape change* induzieren, oder Adrenalin, das alleine keinerlei agonistische Aktivität in gewaschenen Thrombozyten zeigte, versetzt. Es wurde eine deutliche Aggregation beobachtet, die im Fall von ADP reversibel, im Fall von Adrenalin irreversibel war. Diese Aggregation wurde durch Vorinkubation der Thrombozyten mit dem LPA-Rezeptor-Antagonisten DGPP (8:0) nahezu vollständig gehemmt (siehe Abb. 5-10).

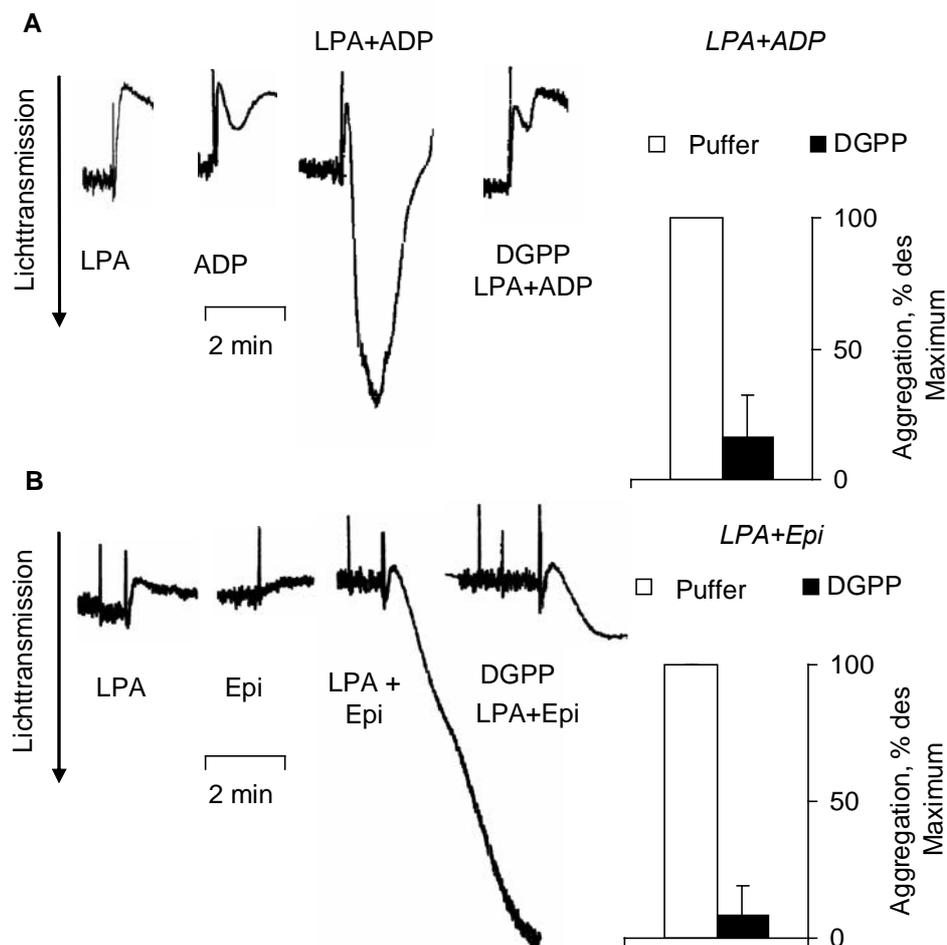


Abbildung 5-10: Synergistische Induktion von Aggregation durch LPA und unterschwellige Konzentrationen von ADP oder Adrenalin. Hemmung durch DGPP (8:0). Hemmung der durch LPA und ADP (A) bzw. LPA und Adrenalin (B) synergistisch induzierten Thrombozytenaggregation mittels DGPP (8:0): Gewaschene Thrombozyten (Standard-Präparation) wurden mit Puffer oder 20 μM DGPP (8:0) inkubiert und nach Zugabe von Fibrinogen (0,5 mg/ml), mit LPA (100 nM) oder ADP (5 μM) bzw. Adrenalin (100 μM) oder beiden Agonisten zusammen, d.h. LPA und ADP (A) bzw. LPA und Adrenalin (B) versetzt. Links sind die Ergebnisse als repräsentative Kurven, rechts als Balkendiagramm dargestellt. Maximale Aggregation durch LPA und ADP bzw. Adrenalin wurde als 100 % Aggregation definiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (in A $n=9$, in B $n=6$).

Auch die potente LPA-Spezies alkyl-LPA (16:0) zeigte in sehr niedriger Konzentration (20 nM) mit ADP eine synergistische Aggregation (siehe Abb. 5-11).

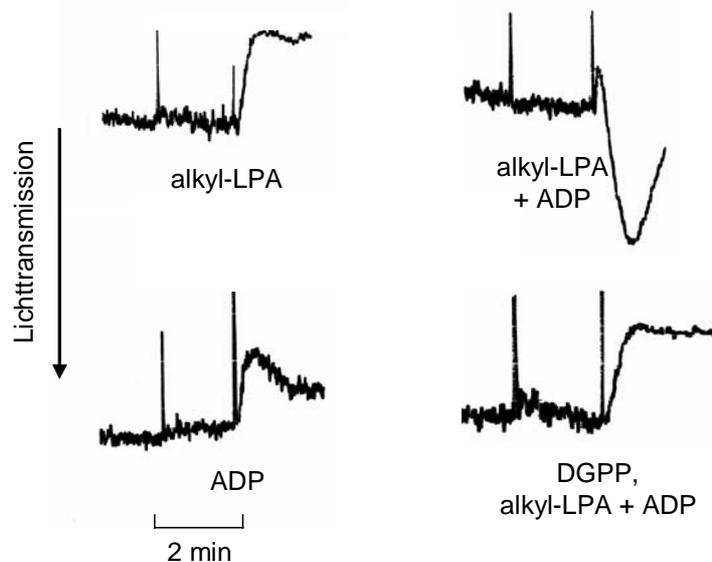


Abbildung 5-11: Synergistische Induktion von Aggregation durch alkyl-LPA und unterschwellige Konzentrationen von ADP. Hemmung durch DGPP (8:0). Gewaschene Thrombozyten (Standard-Präparation) wurden mit Puffer oder 20 μM DGPP (8:0) für 4 min inkubiert und nach Zugabe von Fibrinogen (0,5 mg/ml), mit alkyl-LPA (20 nM) oder ADP (1 μM) oder beiden Agonisten zusammen versetzt. Die gezeigten Kurven sind repräsentativ für n=3 Experimente.

Die Beobachtung, dass LPA mit unterschwelligen Konzentrationen eines weiteren Agonisten eine Aggregation induziert und die Entdeckung, dass Material aus den Lipidkernen von Plaques direkt thrombozytären Gestaltwandel hervorrufen kann, führte zu der Frage, ob Lipidhomogenate mit ADP zusammen eine Thrombozytenaggregation auslösen können. Tatsächlich konnte die zusätzliche Gabe von ADP, nach vorheriger Auslösung des *shape change* mit Plaquematerial, eine maximale irreversible Aggregation auslösen. Vorinkubation der Thrombozyten mit DGPP (8:0) oder NASerPA konnte die synergistische Thrombozytenaggregation hemmen (siehe Abb 5-12). Diese Ergebnisse zeigen, dass LPA aus atherosklerotischen Läsionen synergistisch mit sehr geringen Konzentrationen eines weiteren Agonisten Thrombozytenaggregation hervorrufen kann.

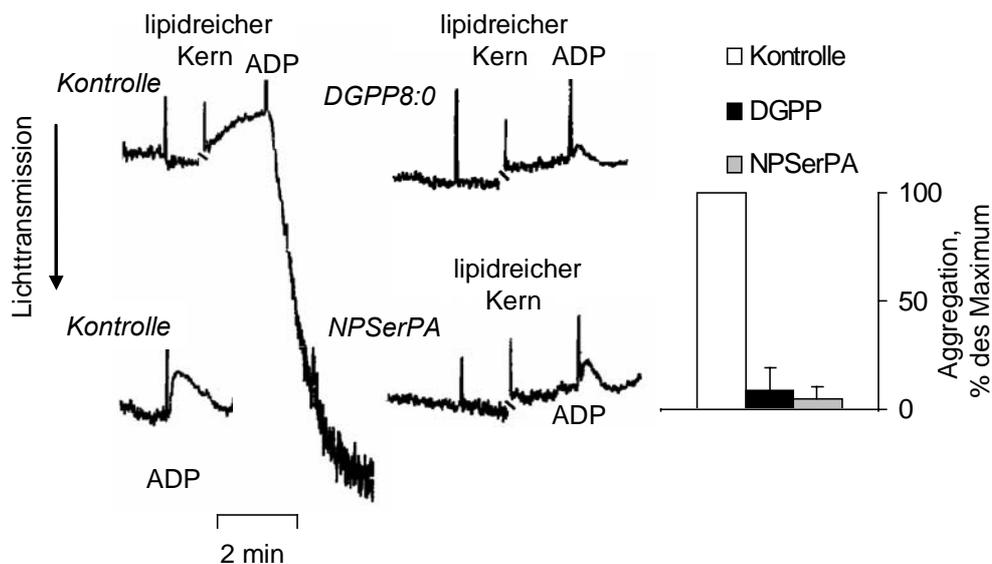


Abbildung 5-12: Synergistische Induktion thrombozytärer Aggregation durch Material des lipidreichen Kernes atherosklerotischer Plaques und unterschwelliger Konzentrationen von ADP. Hemmung durch DGPP (8:0) und NPSerPA. Suspensionen gewaschener humaner Thrombozyten (Thrombozytenpräparation nach Cazenave und Gachet) wurden mit Lösungsmittel (Puffer bzw. 0,2 % Ethanol), 20 μ M DGPP (8:0) oder 2 μ M NPSerPA und nach Zugabe von Fibrinogen (0,5 mg/ml) zuerst mit Material des lipidreichen Kernes versetzt (1mg/ml), gefolgt von Stimulierung mit ADP (1 μ M). Links sind die Ergebnisse als repräsentative Kurven, rechts als Balkendiagramm dargestellt (n=4).

In Thrombozytensuspensionen, die nach Gueguen⁶⁹ hergestellt wurden, induzierten diese Lipidkernhomogenate direkt eine Aggregation (2 Experimente). Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass das im Rahmen der Plättchenaktivierung freigesetzte ADP bei dieser Präparation nicht durch die Apyrase abgebaut wird und somit der synergistischen Signalverstärkung zur Verfügung steht. Die durch *lipid-rich core* Material (0,1 mg/ml) induzierte Aggregation wurde mit 20 μ M DGPP (8:0) gehemmt (Resultate nicht gezeigt).

5.3 Untersuchungen zur klinischen Bedeutung von LPA bei Patienten mit hochgradiger Carotisstenose

5.3.1 Homogenate der Region Plaque-Kern induzieren nicht nur Gestaltwandel, sondern eine Thrombozytenaggregation.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Material des lipidreichen Kernes eines Plaques direkt Thrombozyten aktivieren kann wurde untersucht, ob das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung mit dem LPA-Gehalt der jeweiligen Plaques korreliert. Hierzu

wurden Homogenate der Region Plaque-Kern verwendet. Der LPA-Gehalt ist in Tabelle 5-2 aufgeführt. Wie bereits beschrieben enthalten die Homogenate der Region Plaque-Kern auch die (den eigentlichen Lipidkern) umgebenden faserigen und z.T. verkalkten Anteile des Operationspräparates. Es wurde gefunden, dass diese Anteile alleine eine Thrombozytenaggregation induzieren, im Gegensatz zum ausgelösten Lipidkern, der nur einen Gestaltwandel der Thrombozyten, isoliert nach der Standard-Methode, auslöste (siehe Abb 5-13).

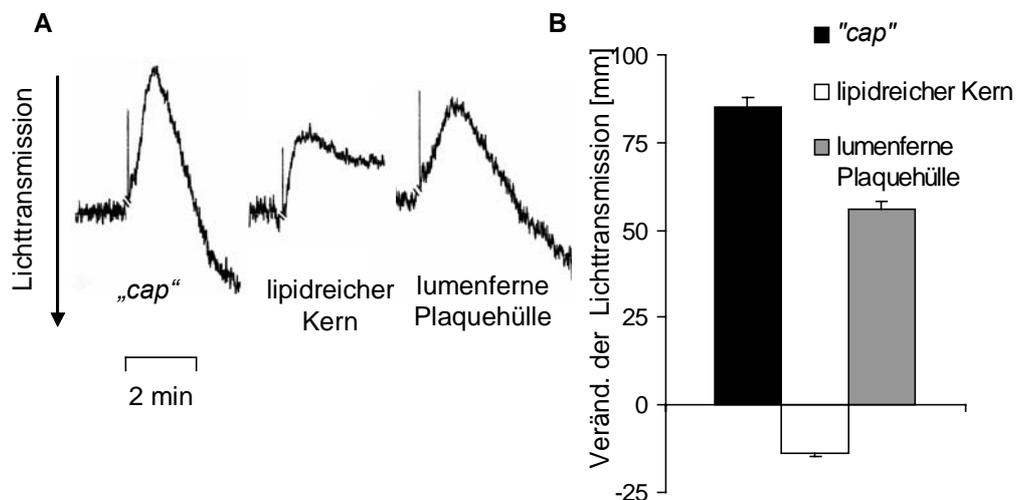


Abbildung 5-13: Thrombozytenaktivierung durch die unterschiedlichen Teile eines atheromatösen Carotisplaques. Ein atheromatöser Carotisplaques (Region Plaque-Kern, siehe Tabelle 4-1) wurde vorsichtig in die lumennahe bindegewebige Kappe („fibrous cap“), den lipidreichen Kern und den lumenfernen bindegewebigen Anteil zerlegt, homogenisiert und zu gewaschenen Thrombozyten (Standard-Methode ohne ASS) gegeben (1mg/ml). (A) Die gezeigten Aggregations- bzw. *shape change* Kurven sind repräsentativ für 4 unterschiedliche Plaques. (B) Das Balkendiagramm zeigt die Aggregation bzw. den *shape change* durch die unterschiedlichen Anteile eines Plaques. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=4 Experimente).

Nach Zugabe von Material des gesamten atheromatösen Plaques (Homogenate der Region Plaque-Kern) zu Thrombozytensuspensionen beobachtete man einen initialen Gestaltwandel, dem dann häufig mit einer Verzögerung von etwa 1 min eine Aggregation folgte. Das Plaquematerial (Region Plaque-Kern) von verschiedenen Patienten wurde zu unterschiedlich präparierten Thrombozytensuspensionen oder Vollblut gegeben und die Aggregation gemessen. Identisches Plaquematerial zeigte in den verschiedenen Präparationen oder Vollblut eine unterschiedliche Thrombozyten-Aggregations-Aktivität. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Excel 2003 (Firma Microsoft) analysiert. Eine Korrelation der

auslösbaren Aggregation in den unterschiedlichen Thrombozytenpräparation durch bestimmtes Plaquematerial war nicht nachweisbar. Die interindividuelle Schwankbreite der gemessenen Aggregation durch einen Plaque bei verschiedenen Thrombozyten-Spendern, aber identischer Methode zur Thrombozytenpräparation, war jedoch gering. Generell war in der Standard-Präparation mit ASS die geringste Aggregation zu beobachten. Die Thrombozyten der *Gueguen*-Präparation (enthalten kein ASS sowie keine Apyrase als ADP abbauendes Enzym) reagierten am empfindlichsten auf Plaquematerial.

5.3.2. Die gemessene Aggregation durch Homogenate der Region Plaque-Kern korreliert nicht mit dessen LPA-Gehalt.

Eine signifikante Korrelation der Aggregation gewaschener Thrombozyten durch die verschiedenen Plaquehomogenate zu deren acyl-LPA-, alkyl-LPA- oder Gesamt-LPA-Gehalten (LC-MS sowie Bioassay) konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5-5). Auch im Vollblut konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den gemessenen LPA-Gehalten der Plaques und der beobachteten Aggregation festgestellt werden.

Tabelle 5-5:

Nr.	Bioassay	acyl-LPA	alkyl-LPA	gesamt LPA	Aggregation			Vollblut
					Standard mit ASS	Standard ohne ASS	Gueguen	
LPA pmol/mg Plaquegewicht					% Lichttransmission			% <i>single platelets</i>
1	20,3 ± 17,9	5,0	3,4	8,5	-	-	-	-
2	-	7,4	4,4	11,7	-	18	-	-
3	30,1 ± 11,2	8,6	3,8	12,4	-	50	21	12
4	8 ± 2,4	2,0	1,6	3,6	-	12	28	25
5	-	21,4	6,9	28,3	-	-	-	-
6	-	2,7	2,6	5,3	-	8	58	11
7	-	4,2	3,6	7,8	-	59	64	51
8	-	4,3	4,6	8,9	-	10	68	27
9	-	6,7	4,1	10,8	5	37	47	15
10	63,4 ± 72,2	14,2	5,8	19,9	4	60	-	-
11	28,6 ± 13,7	5,5	2,7	8,2	6	45	42	71
12	32 ± 7	9,5	5,3	14,7	10	53	-	13
13	55,4 ± 36,7	7,9	8,9	16,8	7	82	70	34
14	11,5 ± 10,6	12,7	10,8	23,5	13	117	90	19
15	16,3 ± 6,7	4,4	7,1	11,5	3	31	96	64
16	7,3 ± 4,2	6,1	7,5	13,6	7	56	75	0
17	62 ± 29,2	9,1	12,7	21,7	3	49	80	58
18	28,7 ± 7,8	5,1	5,5	10,7	8	70	58	20
19	17,3 ± 8,6	3,3	4,9	8,2	14	71	44	52
20	50,6 ± 46,9	8,8	7,4	16,1	13	79	91	-
21	69,4 ± 23,5	6,8	8,0	14,8	0	9	0	0
22	68,7 ± 38,1	14,6	5,7	20,3	4	50	10	0
23	32,4 ± 10	21,8	5	26,8	0	4	65	-

Aggregation, induziert durch Plaquematerial in unterschiedlich präparierten Thrombozytensuspensionen. Es erfolgte die Zugabe von 1 mg/ml Plaquematerial zu gewaschenen Thrombozyten der Standard-Präparation (präpariert mit oder ohne ASS) bzw. 0,1 mg/ml Plaquematerial zu gewaschenen Thrombozyten der *Gueguen*-Präparation. Die Werte bezeichnen die prozentuale Zunahme der Lichttransmission. Als 100 % Wert der Lichttransmission wurde der Lösungspuffer, ohne Thrombozyten, definiert. In Vollblut beschreibt der Wert die prozentuale Abnahme an einzelnen Plättchen (*single platelets*) 5 min nach Zugabe von 0,1 mg/ml Plaquematerial. Die Plaques wurden jeweils mindestens an 2 Thrombozytensuspensionen bzw. Vollblutproben unterschiedlicher Probanden untersucht.

5.3.3 Untersuchung der Hemmung der Plaque-induzierten Thrombozytenaggregation: ADP-Rezeptorantagonisten, ASS, Tyrosinkinasehemmer, DGPP (8:0)

Um die Mechanismen der Plaque-induzierten Aggregation näher zu charakterisieren, wurden unterschiedlich präparierte Thrombozytensuspensionen bzw. Vollblut vor Plaquezugabe mit verschiedenen Plättchen-inhibitorischen Substanzen versetzt (siehe Tabelle 5-6).

Tabelle 5-6:

Hemmsubstanz/ Plaque	Hemm-Mechanismus	Standardpräparation ohne ASS	Präparation nach <i>Gueguen</i>	Vollblut 2 min	Vollblut 5 min
Plaque (Kontrolle)		100 % Thrombozytenaggregation (Aggregation, %)			
ARC 69931 (10 µM)	P2Y ₁₂ (ADP-Rezept.-Ant.)	50	61	63	57
A3P5P (100 µM)	P2Y ₁ (ADP-Rezept.-Ant.)	112	80	122	111
MRS2179 (200 µM)	P2Y ₁ (ADP-Rezept.-Ant.)	100	102	100	95
Genistein (150 µM)	inhib. Tyrosinkinasen	0	0	100	95
PP2 (20 µM)	inhib. Tyrosinkinasen	0	0	21	48
ASS (2 mM)	inhib. Zyklooxygenase 1	18	6	33	73
Lepirudin (200 U/ml)	hemmt Thrombin	100	100	88	63
DGPP (50 µM)	LPA-Rezept.-Antagonist	97	30	88	91

Hemmung der Thrombozytenaggregation durch homogenisiertes Plaquematerial. Gewaschene Thrombozyten bzw. mit Citrat-antikoaguliertes Vollblut wurde mit den genannten inhibitorischen Substanzen für 10 min inkubiert und mit Plaquematerial (Region Plaque-Kern) von einem Patienten stimuliert (1 mg/ml für gewaschene Thrombozyten, Standardpräparation, Vollblut und 0,1 mg/ml für gewaschen Thrombozyten nach *Gueguen* et al.). Die Aggregation wurde gemessen als Zunahme der Lichttransmission in den Thrombozytensuspensionen bzw. Abnahme der Anzahl einzelner Plättchen in Vollblut (zum Zeitpunkt 2 und 5 min). Die induzierbare Aggregation durch Plaquematerial wurde als 100 % Wert definiert (Kontrolle). Alle Werte sind jeweils doppelt an Thrombozytensuspensionen bzw. Vollblutproben von 2 verschiedenen Probanden bestimmt worden.

Als Antagonisten der ADP-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ wurden A3P5P und MRS2179 für den P2Y₁-Rezeptor und AR-C69931MX für den P2Y₁₂-Rezeptor verwendet. Nur durch Inhibierung des P2Y₁₂-Rezeptors konnte die Aggregation durch Plaquematerial signifikant vermindert werden (50 % Abnahme in gewaschenen Plättchen ohne Aspirin, 39 % in *Gueguen*-Plättchen, 37 % in Vollblut nach 2 min bzw. 43 % nach 5 min). Die Antagonisten des P2Y₁ Rezeptors waren in den gewaschenen Plättchen mit Apyrase und in Vollblut ohne nennenswerte Wirkung. Lediglich in den *Gueguen*-Plättchen konnte mit A3P5P, nicht jedoch MRS2179, eine leichte Hemmung der Aggregation um 20 % erreicht werden.

Die intrazelluläre Signaltransduktion der Thrombozyten wurde durch Inkubation mit dem Flavonoid Genistein und PP2 untersucht. Beide inhibieren Tyrosinkinase, die von verschiedenen Thrombozyten-Stimuli unmittelbar nach Rezeptoraktivierung stimuliert werden^{12,61,118}. Die Behandlung mit Genistein und PP2 inhibierte in gewaschenen Thrombozyten vollständig die Plaque-induzierte Aggregation. In Vollblut konnte nur durch PP2 eine deutliche Abnahme der Aggregation beobachtet werden. Genistein und PP2 wurden in DMSO gelöst und der Thrombozytensuspension zugesetzt. In den verwendeten Mengen hatte DMSO alleine keinen Einfluss auf die Plaque-induzierte Thrombozytenaggregation.

ASS hemmte die Aggregation sowohl in den gewaschenen Thrombozyten, als auch im Vollblut (2 min nach Aktivierung) vergleichsweise deutlich. ASS hemmt irreversibel die Zyklooxygenase 1 und somit die Thromboxan A₂ Synthese, einen wesentlichen Amplifikator der Plättchenaktivierung und Aggregation. Die Kombination von ASS mit AR-C69931 erbrachte in einem exemplarischen Experiment eine nur geringe zusätzliche Abnahme der Aggregation. Ähnliche Effekte wurden in einem exemplarischen Experiment mit Propranolol (100 µM) gesehen. Propranolol inhibiert die Freisetzung von Arachidonsäure aus Thrombozyten¹⁵².

Lepirudin (eine Hirudin-ähnliche Substanz, Handelsname: Refludan[®]) hemmt Thrombin durch direkte Bindung an sein katalytisches Zentrum. In gewaschenen Plättchen konnte keine aggregationshemmende Wirkung von Lepirudin beobachtet werden. In Vollblut zeigte sich jedoch, dass v.a. der 5 min Wert der Aggregation durch Lepirudin deutlich beeinflusst wird. Es wurde eine Abnahme der Aggregation um 37% beobachtet. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass es trotz Antikoagulation mit Citrat zu einer geringen Aktivierung des Gerinnungssystems kommt. Das dadurch gebildete Thrombin, welches durch Lepirudin inhibiert wird, könnte für die Thrombozytenaktivierung nach 5 min wichtig sein. Im zeitlichen Verlauf der Aggregation gewinnt das plasmatische Gerinnungssystem nämlich zunehmend an Bedeutung¹⁴².

Für den LPA₁- und LPA₃-Rezeptorantagonisten DGPP (8:0) konnte in gewaschenen Plättchen der Standard-Präparation (mit und ohne ASS) keine Inhibition der Aggregation durch das getestete Plaquehomogenat nachgewiesen werden. Interessanterweise war aber in der *Gueguen*-Präparation (ohne Apyrase) eine deutliche Hemmung zu sehen (Aggregation 31,4 ± 23,7 % der Kontrolle, n=6, siehe Abb. 5-14). Hieraus lässt sich auf eine wichtige Rolle von LPA im Rahmen der synergistischen Thrombozytenaktivierung durch Plaquematerial schließen (siehe Diskussion).

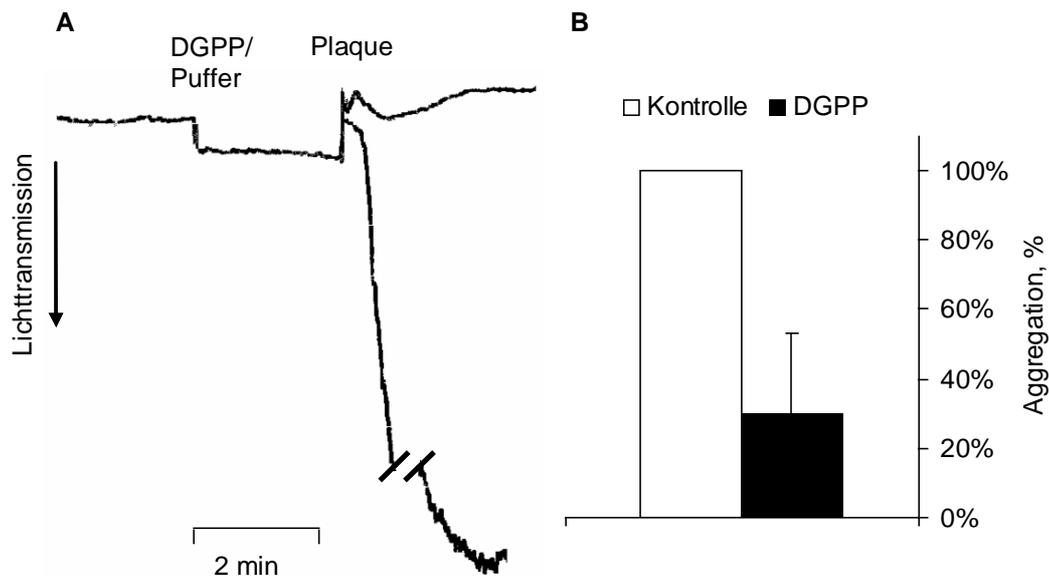


Abbildung 5-14: DGPP (8:0) hemmt die Thrombozytenaggregation durch Homogenate des atheromatösen Plaque-Kerns. Suspensionen gewaschener Thrombozyten, hergestellt nach *Gueguen* et al., wurden entweder mit Puffer oder mit 10 μM DGPP (8:0) für wenige Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von homogenisiertem Plaquematerial, Region Plaque-Kern (0,2 mg/ml). Links (A) sind die Ergebnisse als repräsentative Kurven, rechts (B) als Balkendiagramm dargestellt. Maximale Aggregation durch das Plaquematerial wurde als 100 % Aggregation definiert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD (n=6 Plaques, die an zwei verschiedenen Thrombozytensuspensionen getestet wurden).

In Vollblut zeigte DGPP (8:0) auch in sehr hohen Konzentrationen (bis 200 μM) keine signifikante Hemmung der Plaque-induzierten Aggregation. Gleichwohl konnte auch die durch LPA induzierte Aggregation im Vollblut ($\text{EC}_{50} = 5 \mu\text{M}$ für acyl-(16:0)-LPA⁷²) nicht signifikant durch DGPP (8:0) gehemmt werden.

5.3.4 Der LPA-Gehalt von atherosklerotischen Plaques ist bei Patienten mit bekannter Hypercholesterinämie signifikant höher als bei Patienten ohne Hypercholesterinämie

Neben der Analyse des Plaquematerials auf dessen LPA-Gehalt wurde retrospektiv die Krankengeschichte der operierten Patienten erhoben, u.a. der Medikamenten-Anamnese und des Zeitintervalls zwischen ggf. vorhandener klinischer Symptomatik (TIA, PRIND oder Schlaganfall) und dem Operationstermin. Außerdem wurden die kardiovaskulären Risikofaktoren erfasst (siehe Tabelle 5-7).

Tabelle 5-7:

Nr.	Kardiovaskuläre Risikofaktoren					Medikamenten-Anamnese	klin. Sympt.	Acyl-LPA	Alkyl-LPA	ges. LPA
	aH	HC	Nik	Diab	Anam			pmol/mg Feuchtgewicht		
1	+	+	0	+	+	Betabl., ACE He.	nein	5,0	3,4	8,4
2	+	+	+	+	+	Sar., Stat.	ja	7,7	4,4	11,7
3	+	+	+	-	-	Stat.	ja	8,6	3,8	12,4
4	+	-	-	+	+	Diur., Biguanid, Dig.	nein	2,0	1,6	3,6
5	+	+	(+)	-	+	Betabl., ACE-He.	nein	21,4	6,9	28,3
6	+	-	+	-	+	ACE He.	n. bek.	2,7	2,6	5,3
10	+	+	(+)	+	0	Betabl., ACE He., Diur., Stat., Ins.	nein	14,2	5,8	19,9
11	0	-	+	-	+	Keine	n. bek.	5,5	2,7	8,2
12	+	+	(+)	-	0	ACE He., Stat.	ja	9,5	5,3	14,7
13	+	+	(+)	+	+	ACE He., Stat.	nein	7,9	8,9	16,8
14	+	+	0	+	+	Betabl., CaAnt., Alphabl., Stat.	nein	12,7	10,8	23,5
15	+	-	-	-	+	Betabl., ACE He., Diur.	ja	4,4	7,1	11,5
16	+	+	+	0	+	CaAnt.	n. bek.	6,1	7,5	13,6
17	+	+	(+)	+	+	Betabl., ACE He., Stat.	ja	9,1	12,7	21,7
18	+	+	+	-	+	Betabl., Diur., Stat.	ja	5,1	5,5	10,7
19	+	-	-	+	+	Diur., Biguanid, Dig.	ja	3,3	4,9	8,2
20	+	+	-	+	+	Betabl., ACE He., Diur., SH	ja	8,8	7,4	16,1
21	-	-	+	-	0	Keine	ja	6,8	8,0	14,8
22	-	+	-	+	-	Biguanid	nein	14,6	5,7	20,3

Kardiovaskuläres Risikoprofil, klinische Symptomatik und LPA-Gehalt der Plaques von Patienten, die sich einer Carotis-TEA unterzogen. Die kardiovaskulären Risikofaktoren arterielle Hypertonie (aH), Hypercholesterinämie (HC), Nikotinabusus (Nik), Diabetes mellitus (Diab) und Anamnese (Anam) einer kardiovaskulären Erkrankung (Herzinfarkt, Angina pectoris, früherer Schlaganfall oder pAVK) wurden retrospektiv aus den Krankenakten erfasst. + vorliegender Risikofaktor, - fehlender Risikofaktor, (+) Ex-Nikotinabusus (mindestens 10 *pack years*). Die Feststellung des kardiovaskulären Risikoprofils und der klinischen Symptomatik erfolgte entsprechend aktueller Leitlinien^{3,27}. LPA wurde wie beschrieben aus den Plaques extrahiert und mittels LC-MS quantifiziert. Die Werte sind in pmol/mg Feuchtgewicht angegeben. Abkürzungen Medikamentenanamnese: Betabl. = Betablocker, ACE He. = ACE-Hemmer, Sar. = Sartan (AT1-Antagonist), CaAnt. = Calciumantagonist, Diur. = Diuretikum, Alphabl. = Alphablocker, Stat. = Statin, Ins. = Insulin, Dig. = Digitalis.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie und dem LPA-Gehalt der Plaques konnte gezeigt werden (siehe Abb. 5-15). In Carotisplaques von Patienten mit bekannter Hypercholesterinämie (n=13) fand sich mittels ESI-LC-MS ein Gehalt an acyl-LPA von $10,2 \pm 4,1$ pmol/mg bzw. an alkyl-LPA von $6,8 \pm 4,5$ pmol/mg im Gegensatz zu $4,1 \pm 1,8$ pmol/mg acyl-LPA bzw. $4,5 \pm 2,6$ pmol/mg alkyl-LPA bei Patienten ohne Hypercholesterinämie (n=6).

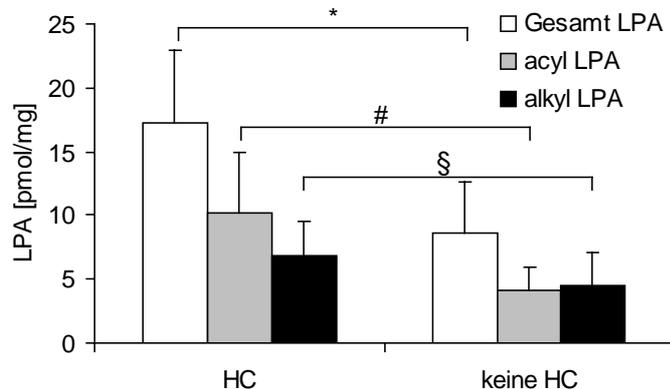


Abbildung 5-15: Carotisplaques von Patienten mit Hypercholesterinämie (HC) enthalten mehr LPA als Plaques von Patienten ohne Hypercholesterinämie. Der mittels LC-MS bestimmte LPA-Gehalt aus Plaques von 19 Patienten, die sich einer Carotis-TEA unterzogen, wurde mit dem Vorliegen einer Hypercholesterinämie (LDL > 160 mg/dl oder Gesamtcholesterin > 200 mg/dl) verglichen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD für n=13 Patienten mit Hypercholesterinämie und n=6 Patienten ohne Hypercholesterinämie. *p < 0,005 für Gesamt-LPA, #p < 0,005 für acyl-LPA, §p < 0,05 für alkyl-LPA.

Für die übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren und LPA-Gehalt (LC-MS und *Bioassay*) konnte keine Korrelation gezeigt werden. Zwischen klinischer Symptomatik und LPA-Gehalt war ebenfalls kein Zusammenhang erkennbar.

5.3.5 Thrombozyten von Patienten mit Carotisstenose reagieren auf LPA empfindlicher als Thrombozyten von gesunden Probanden

Patienten, die sich aufgrund einer hochgradigen bzw. symptomatischen Carotisstenose in stationärer Behandlung befanden, wurde präoperativ 20 ml Blut abgenommen und deren Thrombozyten-Sensitivität auf LPA über die Messung des Formwandels in plättchenreichem Plasma untersucht. Es fand sich ein Mittelwert der EC_{50} für LPA von $4,9 \pm 1,6 \mu\text{M}$ (n=10) im Gegensatz zu $8,6 \pm 2,9 \mu\text{M}$ (n=10) bei gesunden Probanden (siehe Abb. 5-16).

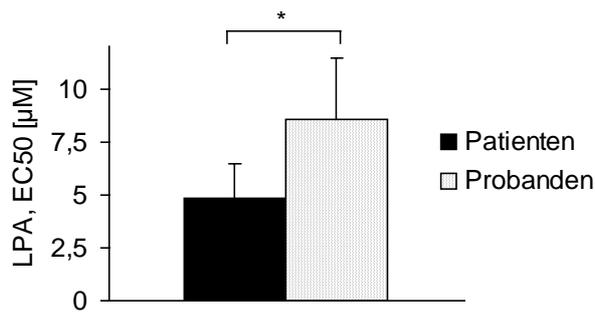


Abbildung 5-16: Thrombozyten von Patienten mit Carotisstenosen reagieren sensitiver auf LPA als eine Kontrollgruppe gesunder junger Erwachsener. Beiden Gruppen wurde mit Citrat antikoaguliertes Blut entnommen, EGTA (2 mM) hinzugegeben und plättchenreiches Plasma hergestellt. Dieses wurde mit 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 und 30 µM LPA stimuliert um in den Thrombozyten Formwandel auszulösen. Der EC₅₀-Wert wurde aus der Dosis-Wirkungskurve extrapoliert. Der maximale *shape change*, induziert durch 30 µM LPA war bei Patienten und Probanden vergleichbar. Die Werte sind Mittelwerte ± SD (n=10 pro Gruppe, *0,05 < p < 0,1).

Außerdem wurde beobachtet, dass im plättchenreichen Plasma (ohne EGTA) von Patienten häufiger eine deutliche Spontanaggregation, alleine durch das Rühren der Thrombozytensuspension, auftrat. Die untersuchten Patienten und Probanden hatten seit mindestens zehn Tagen keinerlei Thrombozytenaggregations- bzw. -funktionshemmer eingenommen.

6 Diskussion

Plaqueruptur mit folgender Thrombose ist häufig die Ursache von Herzinfarkt oder Schlaganfall. Das Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA) akkumuliert in atherosklerotischen Läsionen, v.a. im Bereich des Lipidkerns und gilt u.a. als Agonist der Plättchenaktivierung und -aggregation¹⁵³. Die vorliegende Arbeit beschreibt neue Erkenntnisse über die thrombozytären LPA-Rezeptoren und über Antagonisten der LPA-induzierten Thrombozytenaktivierung. In atherosklerotischen Plaques konnten verschiedene LPA-Spezies mit unterschiedlicher Potenz für die Thrombozytenaktivierung identifiziert werden. Außerdem wurde die Bedeutung von LPA bei der Thrombozytenaktivierung durch homogenisiertes Plaquematerial *in vitro* untersucht sowie anhand einer Fallstudie mit Patienten, die sich wegen hochgradiger bzw. symptomatischer Carotisstenose einer TEA unterzogen, Hinweise auf eine mögliche klinische Bedeutung von LPA gewonnen.

6.1 Die thrombozytären LPA-Rezeptoren

LPA bindet an G-Protein gekoppelte Rezeptoren und an intrazelluläre Rezeptoren. Von den G-Protein gekoppelten Rezeptoren kennt man inzwischen vier, den LPA₁, LPA₂, LPA₃ und LPA₄ Rezeptor^{8,15,74,121}. Von den drei erstgenannten Rezeptoren konnte mRNA in Thrombozyten nachgewiesen werden¹¹², was auf eine Expression dieser Rezeptoren schließen lässt. Die mRNA von LPA₄ konnte in Megakaryozyten-Zelllinien nicht nachgewiesen werden¹²¹. Eine thrombozytäre Expression von LPA₄ ist daher nicht anzunehmen. PPAR γ , der kürzlich als intrazellulärer Rezeptor für LPA beschrieben wurde¹⁰⁶, ist bisher v.a. als nukleärer Transkriptionsfaktor bekannt, konnte aber auch im Cytosol von B-Zell-Lymphomzellen nachgewiesen werden^{85,124}. Akbiyik et al. konnte eine Expression von PPAR γ auch in humanen Megakaryozyten und Thrombozyten nachweisen⁶. PPAR γ -Agonisten (15d-PGJ₂ und Thiazolidinedione-Antidiabetika, z.B. Rosiglitazone) hemmen in humanen Thrombozyten die Thrombin-induzierte Freisetzung von Thromboxan B₂ sowie die Expression und Freisetzung von CD40L (Ligand von CD40), dem proatherogene und plättchenaktivierende Eigenschaften zugeschrieben werden^{36,75,132}. Die Mechanismen wie PPAR γ -Agonisten die Thrombozytenaktivierung beeinflussen sind noch unbekannt⁶. Ebenso ist die Frage über mögliche Wirkung von LPA auf PPAR γ in Thrombozyten bisher nicht erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Phospholipide DGPP (8:0) und PA (8:0) als selektive Antagonisten des LPA-induzierten thrombozytären *shape change* und der Ca^{2+} -Mobilisation beschrieben, wobei DGPP (8:0) in niedrigeren Konzentrationen wirksam war. DGPP wurde 1993 als neues Phospholipid im Madagaskar-Immergrün *Catharanthus roseus*, einer Pflanze aus der Gattung der Hundgiftgewächse entdeckt¹⁸⁸. DGPP kommt in zahlreichen Pflanzen und in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) vor^{90,114,188}. DGPP wird aus Phosphatidsäure und ATP in einer durch die Phosphatidat-Kinase katalysierten Reaktion synthetisiert^{188,189}. Nach Behandlung von unterschiedlichen Pflanzenzellen (*Chlamydomonas*-Zellen, Tomaten- und Kartoffelzellen) mit dem G-Protein-aktivierenden Peptid Mastoparan nahm die intrazelluläre Konzentration von DGPP deutlich zu, was für eine Funktion von DGPP als intrazellulärem Signalüberträger sprechen könnte^{113,114}. In Säugetierzellen wurde DGPP (8:0) bislang nicht nachgewiesen¹¹⁵.

Beide Substanzen, DGPP (8:0) und PA (8:0) waren ohne agonistische Wirkung auf Thrombozyten, im Gegensatz zu den bisher bekannten LPA-Antagonisten wie z.B. NPSerPA oder NPTyrPA und zahlreichen weiteren getesteten Substanzen (siehe Tabelle 5-1). Der antagonistische Effekt von DGPP (8:0) war dosisabhängig und verschob die Dosis-Wirkungskurve nach rechts, was auf eine kompetitive Hemmung hinweist. Hiergegen spricht jedoch, dass die Hemmung des LPA-induzierten thrombozytären *shape change* durch DGPP (8:0) mit der Inkubationszeit (bis zu ca. 5 min) zunahm. Eine intrazelluläre Wirkung von DGPP (8:0) oder eine dauerhafte LPA-Rezeptorveränderung durch kovalente Bindung von DGPP (8:0) erscheint anhand der durchgeführten Auswaschexperimente unwahrscheinlich. Ebenso konnte eine chemische Veränderung von DGPP (8:0) zu einem antagonistisch wirksamen Metaboliten ausgeschlossen werden. Die möglichen Metaboliten PA (8:0), LPA (8:0) oder DAG (8:0) waren entweder nur in signifikant höheren Konzentrationen antagonistisch wirksam (PA 8:0), nicht antagonistisch wirksam (LPA 8:0) oder führten nach Inkubation zu einer unspezifischen Hemmung der Thrombozytenaktivierung (DAG 8:0).

Die hemmende Wirkung von DGPP (8:0) war kritisch von der Länge der beiden Fettsäureketten abhängig. Nur das kurzkettige DGPP (8:0), nicht aber das langkettige DGPP (18:1), zeigte eine antagonistische Wirkung. Fischer et al. konnten anhand mehrerer Zellsysteme (NIH3T3 Fibroblasten, HEY Ovarialkarzinom-Zellen, PC12 Phäochromzytom-Zellen und *Xenopus laevis* Oozyten) und heterologer Expression der einzelnen LPA-Rezeptoren zeigen, dass DGPP (8:0) und PA (8:0) selektive Antagonisten des LPA₁- und LPA₃-Rezeptors sind⁵³. Als Grundlage für diese Entdeckung diente Fischer et al. ein

validiertes Computermodell des S1P₁-Rezeptors¹²⁷ und hierauf basierende Computermodelle der drei LPA-Rezeptoren (LPA₁, LPA₂, LPA₃)^{145,185}. Im Bereich der dritten und siebten Transmembrandomäne dieser Rezeptoren ließen sich konkordant drei Aminosäuren identifizieren, die für die Interaktion mit der polaren Kopfgruppe von LPA entscheidend sind¹⁶⁶. Zusätzlich wurde eine zweite Interaktion des langkettigen hydrophoben Restes von LPA mit dem Rezeptor postuliert, die für die Rezeptoraktivierung entscheidend ist⁵³. Hierauf basierend wurde u.a. die mögliche Wechselwirkung von DGPP (8:0) mit den LPA-Rezeptoren modelliert und die Wirkungen dieser Substanz auf die LPA-induzierte Aktivierung der drei LPA-Rezeptoren untersucht.

Die Hemmung des LPA-induzierten *shape change* und der LPA-induzierter Ca²⁺-Mobilisation durch DGPP (8:0) lassen daher eine wichtige Bedeutung des LPA₁- und/oder des LPA₃-Rezeptors bei der LPA-induzierten Thrombozytenaktivierung vermuten. Als K_i Werte von DGPP (8:0) fanden Fischer et al. 106 ± 28 nM für den LPA₃- und $6,6 \pm 0,68$ μ M für den LPA₁-Rezeptor. Die inhibitorische Wirkung von DGPP (8:0) auf den durch 100 nM LPA induzierten thrombozytären *shape change* lag bei $IC_{50} = 2,5 \pm 0,9$ μ M. Die bekannten LPA-Rezeptorantagonisten NPSerPA und NP_{Tyr}PA konnten in rekombinanten Systemen keine Hemmung des LPA₁- oder LPA₂-Rezeptors zeigen⁸. Auf Thrombozyten wirkten beide Substanzen (in den verwendeten Thrombozytenpräparationen) als LPA-Antagonisten mit partiellem Agonismus. Entsprechende Beobachtungen wurden auch von Sugiura et al. publiziert¹⁶⁰. Diese Daten sprechen für eine Beteiligung v.a. des LPA₃-Rezeptors bei der Aktivierung von Thrombozyten durch LPA.

Bandoh et al. konnten zeigen, dass in Insektenzellen (Sf9-Zellen), die entweder den LPA-Rezeptor LPA₁, LPA₂ oder LPA₃ überexprimierten, acyl-LPA an allen drei Rezeptoren stets ein potenterer Agonist war als alkyl-LPA¹⁵. Alkyl-(16:0)-LPA war aber im direkten Vergleich etwa 18mal so aktiv wie acyl-(16:0)-LPA bezüglich der Induktion des thrombozytären Gestaltwandels (siehe Abb 5-9). Simon et al. fanden sogar eine etwa 30mal höhere Potenz der alkyl-LPA-Spezies gegenüber acyl-LPA-Spezies bezüglich der Induktion der Plättchenaggregation¹⁵⁴. Tokumura et al. publizierten, dass Thrombozyten von zwei Spendern (n=30) überhaupt nicht auf alkyl-LPA, schon aber auf acyl-LPA (sowohl acyl-(18:1)- als auch acyl-(20:4)-LPA), reagierten¹⁷⁰. Ähnliche Beobachtungen konnten in unseren Versuchen (n=14 Probanden) nicht gemacht werden. Die Diskrepanz zwischen hoher Potenz der alkyl-LPA-Spezies (im Vergleich zu acyl-LPA-Spezies) bezüglich der Thrombozytenaktivierung und eher schwächerer Potenz bezüglich der Aktivierung von Zellen mit heterologer

Expression der einzelnen LPA-Rezeptoren sowie die beschriebenen *non-responder*-Plättchen auf alkyl-LPA, nicht aber acyl-LPA, lassen einen, bisher noch unbekanntem alkyl-LPA Rezeptor auf Plättchen vermuten¹⁶⁰.

Vergleicht man die unterschiedliche Potenz verschiedener acyl-LPA-Spezies auf den thrombozytären *shape change* mit Wirkungen dieser acyl-LPA-Spezies auf Zellen mit heterologer Expression von LPA₁, LPA₂ oder LPA₃, fällt auch hier eine deutliche Diskrepanz auf. Bezüglich der Induktion des thrombozytären Gestaltwandels wurde in der vorliegenden Arbeit gefunden, dass acyl-(20:4)-LPA etwa dreifach so potent war wie acyl-(18:1)-LPA (siehe Tabelle 5-1). Bando et al. konnte in Insektenzellen (Sf9-Zellen) mit heterologer Rezeptorexpression keinen Unterschied zwischen diesen beiden LPA-Spezies auf die Aktivierung des LPA₁- und LPA₂-Rezeptors feststellen¹⁶. Auf den LPA₃-Rezeptor hatte acyl-(20:4)-LPA eine zehnfach geringere Potenz im Vergleich zu acyl-(18:1)-LPA¹⁶. Aufgrund dieser und weiterer publizierter pharmakologischer Unterschiede zwischen den bekannten LPA-Rezeptoren und den beobachteten Effekten von LPA sowie mit LPA verwandten Substanzen auf die Thrombozytenaktivierung, postulierten mehrere Autoren einen noch unbekanntem thrombozytären (acyl)-LPA-Rezeptor^{160,170,192}.

Letztlich kann anhand der durchgeführten Experimente und aufgrund der bisher publizierten Literatur keine klare Aussage darüber getroffen werden, welche LPA-Rezeptoren für die LPA-induzierte Thrombozytenaktivierung verantwortlich sind. Jedenfalls konnte mit DGPP (8:0) sowohl die Plättchenaktivierung durch acyl-LPA als auch durch alkyl-LPA gehemmt werden. In Thrombozyten wurde damit erstmals ein LPA-Rezeptor-Antagonist ohne agonistische Wirkungen beschrieben.

6.2 Identifikation von LPA-Spezies mit hoher Thrombozyten-aktivierender Potenz in den Lipidkernen atherosklerotischer Plaques

Nachdem gezeigt worden war, dass LPA in atherosklerotischen Läsionen akkumuliert¹⁵³ (gemessen über Bioassay an Thrombozyten), war es von großem Interesse, weitere Erkenntnisse über die Zusammensetzung der LPA-Spezies, ihre Thrombozyten-aktivierenden Eigenschaften und über mögliche Zusammenhänge mit klinischen Parametern von Atherosklerose-Patienten zu gewinnen. Mittels Flüssigkeits-Chromatographie und kombinierter Massenspektrometrie (LC-MS) gelang es, neben verschiedenen acyl-LPA-Spezies, auch die auf Thrombozyten deutlich potenter wirkenden alkyl-LPA-Spezies in Operationspräparaten humaner Karotisplaques nachzuweisen. Des Weiteren konnte das mehrfach ungesättigte acyl-(20:4)-LPA in Plaques nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass es Thrombozyten mit 6,5fach höherer Potenz als acyl-(16:0)-LPA aktiviert (siehe Abb. 5-9).

LPA ist unter den extrahierten Lipiden eines atherosklerotischen Plaques die wesentliche verantwortliche Substanz für die Thrombozytenaktivierung¹⁵³. Der mittels Bioassay an Thrombozyten gemessene LPA-Gehalt der Plaques lag bei fast allen Patienten höher als der mittels LC-MS gemessene LPA-Gehalt. Bei der biologischen Messung diente acyl-(18:1)-LPA als Vergleichsstandard. Der höhere biologisch gemessene LPA-Gehalt könnte auf die stärkere biologische Wirkung einzelner LPA-Spezies, v.a. von alkyl-(16:0)-LPA und acyl-(20:4)-LPA zurückzuführen sein. Der plättchenaktivierende Effekt eines Plaque-Lipidkerns ist daher nicht alleine von der Gesamtmenge an LPA, sondern v.a. von der Zusammensetzung der einzelnen LPA-Spezies abhängig.

In der Region Plaque-Kern eines Plaques kommt es zur Akkumulation von Abbauprodukten von LDL, unterschiedlich stark oxidiertem LDL und apoptotischen Zellen^{95,100,139}. Vergleicht man die absolute Menge an acyl- bzw. alkyl-LPA und die einzelnen LPA-Spezies in Plaquematerial mit der LPA-Zusammensetzung von nativem und oxidiertem LDL sowie mit den freigesetzten LPA-Spezies nach Thrombozytenstimulation, können möglicherweise Rückschlüsse über die Herkunft von LPA in atherosklerotischen Läsionen gemacht werden.

Einen vergleichenden Überblick über die relativen Anteile der einzelnen LPA-Spezies in Plaquematerial, nLDL und moxLDL, im Plasma, im Serum und nach Thrombozytenstimulation mit Thrombin in Puffer oder Plasma (Messung im Überstand) gibt Tabelle 6-1.

Tabelle 6-1:

	LPA-Spezies				
	16:0	18:0	18:1	18:2	20:4
Plaques (alkyl-LPA)	15%	26%	26%	21%	12%
nLDL (alkyl-LPA) ¹⁹⁴	16%	32%	24%	20%	8%
moxLDL (alkyl-LPA) ¹⁹⁴	8%	30%	40%	20%	2%
Plaques (acyl-LPA)	15%	40%	20%	10%	15%
nLDL (acyl-LPA) ¹⁹⁴	38%	18%	20%	12%	11%
moxLDL (acyl-LPA) ¹⁹⁴	48%	27%	21%	2%	3%
Plasma (acyl-LPA) ¹⁴	12%	13%	15%	50%	11%
Serum (acyl-LPA) ¹⁴	10%	4%	9%	38%	39%
nach Thrombin-Stimulation (Puffer, acyl-LPA) ¹⁴³	4%	69%	9%	3%	15%
nach Thrombin-Stimulation (mit Plasma, acyl-LPA) ¹⁴³	14%	20%	13%	20%	34%

Anteile der einzelnen LPA-Spezies in Plaquematerial, Plasma, Serum und im Überstand nach Thrombozytenstimulation mit Thrombin. Die Analyse der aufgelisteten biologischen Proben erfolgte mittels LC-MS im Labor von *D. Baker, Department of Physiology, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, Tennessee, USA*. Die Daten für acyl-LPA bzw. alkyl-LPA in nLDL (natives LDL) und moxLDL (milde oxidiertes LDL), im Plasma, im Serum und im Überstand nach Thrombin-Stimulation wurden der zitierten Fachliteratur entnommen. Die aufgeführten LPA-Spezies umfassen ca. 95 % des LPAs in Plasma und Serum¹⁴.

In den untersuchten Plaques fand sich ein hoher Anteil an alkyl-LPA-Spezies (36 % des Gesamt-LPAs). Zhang et al. konnten zeigen, dass während der milden Oxidation von LDL alkyl-LPA um das ca. 6fache zunimmt¹⁹⁴. In moxLDL beträgt der Anteil an alkyl-LPA etwa 50 % des Gesamt-LPA-Gehaltes im Unterschied zu 5 % alkyl-LPA in nLDL. Die Akkumulation von oxidiertem LDL in atherosklerotischen Läsionen dürfte daher die Erhöhung von alkyl-LPA in Plaquematerial bedingen. Zhang et al. zeigten des Weiteren, dass im Rahmen der oxidativen Veränderung der Gehalt der LDL-Partikel an acyl-LPA etwa gleich bleibt, wobei der relative Anteil an LPA-Spezies mit mehrfach ungesättigten Fettsäureresten abnimmt zugunsten von LPA-Spezies mit gesättigten Fettsäureresten. Auch im untersuchten Plaquematerial fand sich ein hoher Anteil (etwa 55 %) an acyl-LPA-Spezies mit gesättigten Fettsäureresten.

Allerdings fiel ein deutlicher Unterschied zwischen moxLDL und Plaquematerial bezüglich der LPA-Spezies mit mehrfach ungesättigten Fettsäureresten (18:2 und 20:4) auf. Neben der Akkumulation von oxidierten LDL-Partikeln scheint es deshalb noch weitere Quellen von LPA in den Plaques, v.a. von LPA-Spezies mit ungesättigten Fettsäureresten, zu geben. Bei

einer Plaqueruptur mit lokal begrenzter Thrombose oder bei Mikroeinblutungen in einen Plaque könnte durch Thrombozytenaktivierung LPA freigesetzt werden. Thrombin-stimulierte Plättchen setzen vergleichsweise große Mengen des potenten acyl-(20:4)-LPA frei (34% des gesamten freigesetzten LPA, siehe Tabelle 6-1)^{64,143}. Tatsächlich fanden sich in den untersuchten Lipid-Kernen der Plaques $15 \% \pm 7 \%$ acyl-(20:4)-LPA. Vergleicht man diesen Anteil mit dem geringen Anteil von acyl-(20:4)-LPA in moxLDL (2 %)¹⁹⁴, so unterstützt der höhere Anteil an acyl-(20:4)-LPA in Plaquematerial diese Hypothese. Weitere denkbare Quellen für LPA in Plaquematerial könnte die Akkumulation von nLDL bzw. nur gering oxidativ veränderter LDL-Partikel sein, die einen höheren Anteil an LPA-Spezies mit ungesättigten Fettsäureresten haben. Außerdem könnte LPA aus Membranbestandteilen apoptotischer Zellen mittels im Plaque vorhandener sPLA₂ und lyso-PLD, wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben, gebildet werden.

Bemerkenswert ist die Akkumulation von alkyl-LPA und acyl-20:4-LPA in Plaques aus zwei Gründen. Erstens besitzen diese LPA-Spezies, wie beschrieben, hohe Thrombozyten-aktivierende Potenz. Zweitens wirken diese LPA-Spezies agonistisch auf den PPAR γ -Rezeptor¹⁰⁶, dessen Aktivierung die Schaumzellbildung und Neointimaprogression begünstigt (siehe Seite 90)¹⁹³. Acyl-LPA-Spezies mit gesättigte Fettsäuren erscheinen hierbei nicht wirksam zu sein^{193,194}. Die Akkumulation von moxLDL, nLDL und apoptotischen Zellen in atherosklerotischen Läsionen sowie eine lokale Aktivierung von Thrombozyten dürfte also nicht nur die quantitative Erhöhung von LPA innerhalb arteriosklerotischer Plaques verursachen, sondern auch einen erhöhten Anteil an besonders thrombogenen und atherogenen LPA-Spezies bewirken¹⁵¹.

6.3 Der Lipidkern atherosklerotischer Plaques induziert thrombozytären Gestaltwandel und triggert die Plättchenaggregation über die Aktivierung von LPA-Rezeptoren

LPA entsteht bei der oxidativen Modifikation von LDL und akkumuliert in atherosklerotischen Läsionen¹⁵³. Weiterhin wurde gezeigt, dass LPA für die Induktion der Thrombozytenaktivierung sowohl durch oxLDL als auch durch Lipidextrakte aus atherosklerotischen Läsionen verantwortlich ist¹⁵³. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sind die Resultate dieser Arbeit, dass der *shape change*, induziert durch oxLDL oder Lipidextrakte aus Plaquematerial, durch DGPP (8:0) fast vollständig zu hemmen war.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gefunden, dass der isolierte Lipidkern aus weichen humanen Karotisplaques direkt Thrombozyten aktiviert und einen raschen Gestaltwandel der Plättchen hervorruft. Der Formwandel konnte auch morphologisch mittels konfokaler Mikroskopie gezeigt werden. Das Aktin-Zytoskelett zeigte die typische Zunahme und Reorganisation des F-Aktins, die dem *shape change* zugrunde liegen. Der durch den Lipidkern induzierte thrombozytäre Gestaltwandel konnte vollständig durch die LPA-Rezeptor-Antagonisten DGPP(8:0) und NPSerPA gehemmt werden. Hieraus lässt sich eine entscheidende Rolle von LPA als plättchenaktivierende Substanz innerhalb des Stoffgemenges, das in atherosklerotischen Lipidkernen enthalten ist, ableiten. Neben dem chemisch-physikalischen Nachweis potenter LPA-Spezies in atherosklerotischen Plaques gelang es hiermit erstmals, die Thrombozyten-aktivierende Wirkung von LPA im Kontext mit anderen Bestandteilen des Lipidkerns zu zeigen.

Außer Lysophosphatidsäure sind in der Literatur zahlreiche weitere plättchenaktivierende und thrombogene Substanzen in atherosklerotischen Läsionen beschrieben. *Tissue factor* (TF) ist ein Protein, das, gebunden an Mikropartikeln, in hoher Konzentration im Kern atherosklerotischer Läsionen zu finden ist¹⁰². TF wird als ein wesentlicher Initiator der Gerinnung und Thrombusbildung nach Plaqueruptur betrachtet^{31,110}. TF-Aktivierung führt zur Bildung von Thrombin, ein potenter Stimulus der Thrombozytenaktivierung und Fibrinbildung. Für die TF-Aktivierung ist seine Bindung an Faktor VIIa im Plasma Voraussetzung⁴⁵. Da die durchgeführten Experimente hauptsächlich mit gewaschenen Thrombozyten stattfanden, war eine Komplexbildung zwischen TF und Faktor VIIa nicht

möglich. Eine Aussage über die TF-vermittelte Thrombozytenaktivierung im Vergleich zu LPA-induzierter Thrombozytenaktivierung kann deshalb nicht getroffen werden. Cholesterolsulfat ist ein weiteres Molekül, das im lipidreichen Kern akkumuliert und, unabhängig von bekannten adhäsiven Thrombozytenoberflächen-Proteinen (GPIb, GPIIb-IIIa, CD36) die Thrombozyten-Adhäsion stimuliert¹⁰⁷. Die genauen Mechanismen, die dieser Beobachtung zu Grunde liegen sind allerdings nicht verstanden. Die Interaktion zwischen Cholesterolsulfat und Thrombozyten scheint durch Inkorporation von Cholesterolsulfat in die Plättchenmembran stattzufinden²¹. Cholesterolsulfat alleine induziert keine Thrombozytenaggregation, es wirkt jedoch synergistisch mit ADP und Thrombin auf die Thrombozytenaktivierung²¹. Eine weitere erwähnenswerte Substanz ist das chemotaktische Zytokin *stromal cell-derived factor-1*⁴ (SDF-1), das in atherosklerotischen Plaques, nicht aber in der normalen Gefäßwand, vorkommt und in hoher Konzentration eine Plättchenaggregation induzieren kann. Die publizierte Literatur ist diesbezüglich jedoch widersprüchlich, da Kowalska et al. keinen Effekt dieses Zytokins auf die Plättchenaggregation oder intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhungen zeigen konnte⁸⁷. Oxidativ veränderte Phosphatidylcholin-Moleküle (oxPC) mit PAF-ähnlicher Aktivität finden sich ebenfalls vermehrt in Plaques und können Thrombozyten aktivieren⁸³.

Insgesamt spielen diese Thrombozyten-aktivierenden Substanzen (Cholesterolsulfat, SDF-1, oxPC) im Vergleich zu LPA bezüglich der Induktion des thrombozytären Gestaltwandels durch den Lipidkern atherosklerotischer Läsionen keine Rolle, da mit zwei unterschiedlichen LPA-Rezeptorantagonisten (DGPP (8:0) und NASerPA) eine nahezu vollständige Hemmung des *shape change* durch den Lipidkern beobachtet wurde.

Von den untersuchten 12 lipidreichen *core regions* zeigten nur 7 eine Thrombozyten-aktivierende Wirkung. Die Gründe für das Fehlen der Thrombozytenaktivierung durch die anderen Plaques sind letztlich unklar. Mögliche Hypothesen sind das Vorhandensein inhibitorisch wirkender Substanzen oder ein geringerer Gehalt an stark wirksamen LPA-Spezies. Eine Analyse der LPA-Spezies mittels LC-MS wurde in diesen Proben leider nicht durchgeführt.

LPA und Lipidkerne riefen in Suspensionen gewaschener, mit ASS vorbehandelter Thrombozyten, die Apyrase enthielten, nur *shape change*, jedoch keine Aggregation hervor. Pathophysiologisch ist jedoch v.a. die Thrombozytenaggregation von Bedeutung. Es wurde gefunden, dass niedrige Konzentrationen weiterer Plättchenagonisten, wie ADP und Adrenalin, synergistisch mit LPA wirkten und eine Aggregation induzierten. Diese

synergistische Thrombozytenaggregation war vollständig durch DGPP (8:0) und NPSerPA hemmbar. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass LPA eine Schlüsselrolle bei der Thrombozytenaktivierung durch den *lipid rich core* innehat.

In gewaschenen Plättchenpräparationen, die keine ADP abbauenden Enzyme oder Aspirin enthielten, induzierte LPA raschen Gestaltwandel und Aggregation. Die Erklärung hierfür ist wahrscheinlich, dass bei dieser Art der Thrombozytenpräparation nach Gueguen et al.⁶⁹ bereits ADP in der Thrombozytensuspension vorhanden ist, welches dann mit LPA synergistisch wirken kann. Durch DGPP (8:0) konnte eine deutliche Hemmung der Aggregation erreicht werden. Die Zugabe von ADP-Rezeptor-Antagonisten, sowohl des P2Y₁₂-, als auch des P2Y₁-Rezeptors, führte die irreversible Aggregation in eine reversible Aggregation über. *Shape change* und reversible Aggregation waren weiterhin sichtbar.

Obwohl die Plättchenaktivierung einen sehr komplexen Mechanismus mit zahlreichen selbst verstärkenden Regelkreisen darstellt, scheint die Aktivierung von zwei Rezeptoren, die an verschiedene G-Proteine koppeln und unterschiedliche Wege der intrazellulären Signaltransduktion aktivieren, ausreichend um eine Aggregation zu induzieren^{122,149}. Es konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Aktivierung von G₁₃- und G_i-vermittelten Signalkaskaden synergistisch zu einer vollständigen Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors führt (GPIIb-IIIa)¹¹⁹. Die Kostimulation von G₁₃ durch LPA und von G_i durch ADP oder Adrenalin lag deshalb vermutlich der beobachteten synergistischen Induktion der Aggregation zugrunde.

6.4 Plättchenaggregation durch Homogenate von humanen Atherosklerose-Plaques

Im Rahmen einer Plaqueruptur tritt der Blutstrom, neben den schon genannten thrombogenen Bestandteilen des Lipidkerns, auch mit subendotheliale Matrixmaterial, v.a. Kollagen, Fibronectin und Laminin in Verbindung^{142,167,172}. Die hierdurch initiierten Mechanismen der Plättchenaktivierung bzw. die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems gleichen weitgehend physiologischen Vorgängen der Hämostase. Ein wichtiger gemeinsamer Endpunkt der verschiedenen Signalkaskaden ist die Aktivierung des GPIIb-IIIa Rezeptors^{43,131}. Hierüber wird Fibrinogen gebunden und die Thrombozyten miteinander vernetzt.

Homogenisiert man das komplette Operationspräparat nach TEA der *A. carotis* so enthält das Homogenat auch die, den eigentlichen Lipidkern umgebenden faserigen und z.T. verkalkten Anteile. Ein solches Homogenat enthält die o.g. subendothelialen Matrixbestandteile, v.a. Kollagen. Diese Homogenate induzierten in der Standard-Präparation (mit und ohne ASS) eine Aggregation mit etwa einminütiger Verzögerung, wie man sie auch bei Zugabe von Kollagen-Reagenz beobachten konnte. Durch Auftrennung eines Plaques in seine lumennahe bindegewebige Kappe, den weichen lipidreichen Kern sowie den lumenfernen bindegewebigen Teil und Zugabe der entsprechenden Homogenate zu Thrombozyten konnte man erkennen, dass die bindegewebigen Anteile anders als der lipidreiche Kern die Thrombozyten aktivierten. Die faserigen Anteile riefen in gewaschenen Thrombozyten (Standard-Präparation) nach einer Verzögerung von etwa 1 min Gestaltwandel und Aggregation hervor, während der lipidreiche Kern unmittelbar nach Zugabe einen Gestaltwandel induzierte – ohne anschließende Thrombozytenaggregation.

Durch die Hemmung der Plaque-induzierten Aggregation mit verschiedenen inhibitorisch wirksamen Substanzen, ließen sich Rückschlüsse auf hierfür wesentliche Thrombozyten-Rezeptoren und Plaquekomponenten ziehen.

Der LPA-Rezeptorantagonist DGPP (8:0) zeigte keine Hemmung der Plaque-induzierten Aggregation in Thrombozytensuspensionen, die Apyrase enthielten. Nur in Thrombozytensuspensionen nach Gueguen, die wahrscheinlich ADP enthielten (siehe oben), war durch DGPP (8:0) eine Hemmung der Plaque-induzierten Aggregation um ca. 60 % erkennbar. Zugabe von Apyrase zur diesen Thrombozyten schwächte die Plaque-induzierte Aggregation ab. Eine Hemmung dieser verbliebenen Aggregation durch DGPP (8:0) war dann nicht mehr erkennbar (Daten nicht gezeigt). Es scheint also, dass DGPP (8:0) nur dann inhibitorisch wirkte, wenn sich Synergismen zwischen LPA aus dem Plaquematerial und ADP entfalten konnten. Bemerkenswert ist, dass DGPP (8:0) in diesen Präparationen auch einen leicht hemmenden Effekt auf die ADP-induzierte Aggregation hatte. Dies lässt sich möglicherweise durch die fehlende synergistische Wirkung (fehlendes positives *feed-back*) des während der Thrombozytenaktivierung freigesetzten LPA erklären. In dieser Präparation scheint LPA eine wichtige Bedeutung bei der Plaque-induzierten Aggregation zuzukommen.

Eine deutliche Verringerung der Aggregation durch Plaquematerial in unterschiedlich präparierten, gewaschenen Thrombozyten und in Vollblut war durch den Antagonisten des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ erreichbar. Antagonisten des P2Y₁-Rezeptors zeigten keine inhibitorische Wirkung. Die beiden ADP-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ scheinen

komplementäre Rollen bei der Thrombozytenaktivierung einzunehmen⁶⁰: ADP induziert über den P2Y₁-Rezeptor die Aggregation^{49,91,92}, wohingegen der P2Y₁₂-Rezeptor die Thrombozytenaggregate stabilisiert⁵⁴. Die Stabilisierung der Aggregation durch den P2Y₁₂-Rezeptor scheint bei der Thrombozytenaktivierung durch homogenisiertes Plaquematerial eine wesentliche Rolle zu spielen.

Die Inkubation gewaschener Thrombozyten mit ASS hemmte deutlich die Plaque-induzierte Aggregation. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass die Interaktion der Thrombozyten mit Matrixbestandteilen (Kollagen, Laminin, Fibronectin) einen entscheidenden Auslöser der beobachteten Aggregation darstellt, da hierdurch u.a. Thromboxan A₂ freigesetzt wird⁶². Eine solche Hypothese unterstützende, komplette Inhibierung der Plaque-induzierten Aggregation konnte durch Tyrosinkinase-Hemmer (Genistein oder PP2, letzterer ist ein Hemmer der Src-Tyrosinkinasen) beobachtet werden. Die Aktivierung von Src-Tyrosinkinasen ist wesentlich verantwortlich für die intrazelluläre Signaltransduktion nach Kollagen-induzierter Stimulierung der beiden Kollagen-Rezeptoren Integrin $\alpha 2\beta 1$ und Glykoprotein VI (GP VI) auf der Thrombozytenoberfläche¹⁸⁶. Zusätzlich vermittelt die Aktivierung von Src-Tyrosinkinasen die vermehrte Exposition von Fibrinogen-Bindungsstellen auf dem Integrin $\alpha IIb\beta 3$ auf Thrombozyten¹⁷. Aus den durchgeführten Versuchen ist daher abzuleiten, dass v.a. Matrix-Komponenten des homogenisierten Plaquematerials, wie z.B. Kollagen, wesentlich für die Thrombozytenaktivierung über Freisetzung von ADP und TXA₂ verantwortlich sind¹³⁰.

LPA scheint bei der Aggregation gewaschener Thrombozyten durch homogenisiertes Plaquematerial nur dann eine wichtige Rolle zuzukommen, wenn ADP zur Verfügung steht. Es konnte gezeigt werden, dass ASS keinen Einfluss auf die LPA-induzierte Thrombozytenaggregation hat (eigene Daten und Haseruck et al.⁷²). Die LPA-induzierte Aggregation scheint daher unabhängig von TXA₂-Freisetzung zu sein. In Vollblut konnte mit dem LPA-Rezeptorantagonist DGPP (8:0) keine signifikante Hemmung der Plaque-induzierten Aggregation beobachtet werden. Möglicherweise bindet DGPP (8:0) an Plasmaproteine wie Albumin und steht dann nicht mehr in hinreichender Konzentration als Antagonist der LPA-Rezeptoren zur Verfügung. Eine weitere Erklärung wäre ein rascher Abbau durch Phosphatasen zu geringer wirksamen oder unwirksamen Metaboliten. Zur Klärung der Bedeutung von LPA bei der Thrombozytenaggregation durch Plaquematerial in Vollblut wären LPA-Rezeptorantagonisten, die in Vollblut wirksam sind wünschenswert.

6.5 Hinweise auf die klinische Bedeutung von LPA und Ausblick in die Zukunft

Die Faktoren, die eine verstärkte thrombozytäre Reaktion am Ort einer Plaqueruptur bedingen sind vielfältig. Die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines möglicherweise vital bedrohlichen Thrombus resultiert v.a. aus der Reaktivität der Thrombozyten, der Exposition thrombogener Plaquebestandteile, rheologischen Störungen und dem Zusammenbruch endothelialer antithrombotischer Schutzmechanismen⁸¹.

Erhöhte Thrombozytenreaktivität unterstützt die Bildung eines okklusiven Thrombus. Patienten mit hyperreaktiven Plättchen erleiden häufiger akute koronare Ereignisse^{77,173} und insbesondere Diabetiker, die hyperreaktive Thrombozyten haben, profitieren stärker von intensiver Thrombozytenfunktionshemmung^{98,137}. Die Mechanismen, die der Hyperreaktivität von Thrombozyten zugrunde liegen sind weitgehend unverstanden. Es wird vermutet, dass verschiedene erblich bedingte Faktoren und erworbene Einflüsse bedeutsam sind⁸¹. Erhöhte Thrombozytenreaktivität wurde für Patienten mit arterieller Hypertonie^{71,86}, Diabetes⁷¹, Hypercholesterinämie¹²³, bei Zigarettenrauchern¹⁶² und mit zunehmendem Alter¹⁶³ berichtet. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass Patienten mit operationswürdigen Carotisstenosen sensitiver auf LPA reagieren als eine Kontrollgruppe gesunder junger Erwachsener. Kritisch muss jedoch angemerkt werden, dass das Alter in den beiden Gruppen so unterschiedlich ist, dass eine Vergleichbarkeit nicht gegeben ist. Außerdem wurde in der Patientengruppe eine erhöhte Neigung zur Spontanaggregation beobachtet. Falls sich diese Befunde in einer klinischen Studie bestätigen sollten, könnte die höhere LPA-Sensitivität der Thrombozyten ein zusätzliches Gefährdungspotential der Patienten bei Exposition des Blutstroms zu LPA-haltigem Plaquematerial bedeuten.

Besonders hohe Mengen an LPA fanden sich in Plaques von Patienten mit bekannter Hypercholesterinämie. Hypercholesterinämie ist einer der wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren¹⁴⁰, wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte^{2,89}. Patienten mit Hypercholesterinämie haben einen hohen Spiegel an LDL-Cholesterin, das, unterstützt durch die endotheliale Dysfunktion, in der Intima atherosklerotischer Arterien verstärkt akkumulieren kann. Der gezeigte Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie und hohem LPA-Gehalt der Plaques bestätigt die Hypothese, dass LPA vor allem aus in den Plaques akkumuliertem LDL und oxLDL stammt¹⁵³. Besonders kritisch könnte der signifikant höhere

Gehalt an alkyl-LPA-Spezies in Plaques von Patienten mit Hypercholesterinämie sein. Zhang et al. konnten zeigen, dass während der oxidativen Modifikation von LDL alkyl-LPA entsteht¹⁹⁴. Alkyl-LPA ist nicht nur bezüglich seiner thrombozytären Wirkung potenter als acyl-LPA, sondern auch bezüglich seiner atherogenen Wirkung.

Alkyl-LPA Spezies und ungesättigte acyl-LPA Spezies binden und aktivieren den Transkriptionsfaktor PPAR γ ¹⁰⁶. Es konnte gezeigt werden, dass LPA über diesen Mechanismus die Transkription von CD36 hoch reguliert. Dies ist von herausragender Bedeutung, da der CD36 Rezeptor auf Makrophagen eine essentielle Bedeutung bei der Akkumulation von ox-LDL und somit der Bildung von Schaumzellen hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass LPA die Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen induziert und *in vivo* die Neointima-Bildung über PPAR γ -Aktivierung hervorruft^{193,194,73}. Yoshida et al. infundierte über eine spezielle minimal-invasive Technik LPA in die abgeklemmte *A. carotis communis* von Ratten¹⁹³. Nach 7 Tagen konnten, allerdings nur durch ungesättigte LPA-Spezies, deutliche Zeichen der Neointima-Bildung beobachtet werden. Zhang et al. konnten zeigen, dass mox-LDL, alkyl-LPA und acyl-(20:4)-LPA, nicht aber natives LDL, in diesem Modell eine deutliche Neointima-Progression induziert¹⁹⁴. Diese wurde durch direkte LPA-induzierte Aktivierung von PPAR γ verursacht.

Es scheint, dass LPA, einerseits durch seine Thrombozyten-aktivierende Potenz und andererseits durch die Hochregulation von CD-36-vermittelter Aufnahme von ox-LDL, das wesentliche Bindeglied zweier sich selbst verstärkender Regelkreise - LPA-Bildung durch (aktivierte) Thrombozyten sowie moxLDL und hierdurch Bereitstellung von Liganden für PPAR γ – darstellt. Lysophosphatidsäure scheint also bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose und als Mediator der arteriellen Thrombose, die den oftmals letalen Endpunkt kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt, eine wichtige Rolle zu spielen.

Entsprechend erscheinen LPA-Rezeptor Antagonisten oder Beeinflussung der LPA vermittelten Signaltransduktion als neuartige Therapieansätze bei der Behandlung der Zivilisationskrankheit Atherosklerose sinnvoll. Die Substanz DGPP (8:0) konnte als neuer LPA-Rezeptorantagonist der LPA-induzierten Thrombozytenaktivierung beschrieben werden und könnte möglicherweise als Leitstruktur für neue potente LPA-Rezeptorantagonisten dienen.

7 Zusammenfassung

Oxidative Veränderungen von LDL-Partikeln und Aktivierung der Blutplättchen spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen. Lysophosphatidsäure (LPA) ist eine thrombogene Substanz, die in oxidativ modifizierten LDL-Partikeln (mox-LDL) und atherosklerotischen Läsionen enthalten ist.

Kurzkettige Analoga von Phosphatidsäure wurden auf ihren Effekt auf zwei initiale thrombozytäre Antworten, Gestaltwandel (*shape change*) und Ca^{2+} -Mobilisation, untersucht. Dioctylglycerol Pyrophosphat [DGPP(8:0)] und Dioctyl-Phosphatidsäure [PA(8:0)], die kürzlich als selektive Antagonisten des LPA_1 - und LPA_3 -Rezeptors beschrieben wurden, inhibierten spezifisch die Thrombozytenaktivierung durch LPA. DGPP (8:0) war hierbei ein potenterer Antagonist als PA (8:0). DGPP (8:0) hemmte auch den thrombozytären *shape change* durch mox-LDL und Lipidextrakte aus humanen atherosklerotischen Plaques. Bemerkenswerterweise konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der lipidreiche Kern atherosklerotischer Plaques direkt den *shape change* induzierte. Dieser Effekt war durch Vorinkubation mit DGPP (8:0) vollständig zu hemmen. Überdies konnte durch gemeinsame Gabe des lipidreichen Kerns oder LPA mit unterschwelligen Konzentrationen ADP oder Adrenalin eine deutliche synergistische Aggregation hervorgerufen werden, welche wiederum durch DGPP (8:0) gehemmt werden konnte. Durch Analyse von Plaquematerial mittels Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie ließen sich besonders potente Thrombozyten-aktivierende LPA-Spezies (16:0-alkyl-LPA und 20:4-acyl-LPA) identifizieren. Homogenate des gesamten atheromatösen Plaques induzierten Aggregation, die nicht mit dem LPA-Gehalt der Plaques korrelierte. Maßgeblich für die Aggregation schienen v.a. Matrixbestandteile, wie Kollagen zu sein. Im Rahmen von Untersuchungen zur klinischen Bedeutung von LPA fand sich bei Patienten mit Carotisstenosen, die eine Hypercholesterinämie hatten, ein signifikant höherer Gehalt an LPA im Plaquematerial als bei Patienten mit normalen Cholesterinwerten. Außerdem reagierten Thrombozyten von Patienten mit manifester Atherosklerose sensitiver auf LPA als Blutplättchen von gesunden Probanden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass LPA eine Schlüsselrolle bei der Thrombozytenaktivierung durch den vulnerablen Lipidkern atherosklerotischer Läsionen besitzt. LPA-Moleküle des lipidreichen Kerns induzierten eine rasche Plättchenaktivierung, wahrscheinlich über Aktivierung von LPA_1 - und LPA_3 -Rezeptoren. Spezifische Antagonisten der thrombozytären LPA-Rezeptoren könnten als wirkungsvolle Inhibitoren der arteriellen Thrombusbildung bei Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten dienen.

8 Abkürzungsverzeichnis

Symbole

x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung	- I -	
μM	mikromolar	IC	inhibitorische Konzentration
% (v/v)	Volumenprozent	IL-2	Interleukin 2
% (w/v)	Gewichtsprozent	- L -	
- A -		LC	Flüssigkeits-Chromatographie
A3P5P	ein P2Y ₁ -Rezeptorantagonist	LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
Abb.	Abbildung	LDL	Lipoprotein geringer Dichte
acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A	LPA	Lysophosphatidsäure
ADP	Adenosindiphosphat	LPAAT	LPA-Acetyltransferase
AR-C69931	ein P2Y ₁₂ -Rezeptorantagonist	LPC	Lysophosphatidylcholin
ASS	Acetylsalicylsäure	LPP	Lipidphosphat-Phosphohydrolasen
ATP	Adenosintriphosphat		
ATX	Autotaxin		
- B -		- M -	
BSA	Rinderserumalbumin	M	molar
- C -		MAG	Monoacylglycerol
CD	bestimmtes zelluläres Oberflächenmolekül, z.B. CD36	MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
COX-1	Zyklooxygenase 1	mM	millimolar
- D -		MMP	Matrix-Metalloproteinase
DGPP	Diacylglycerolpyrophosphat	MRS2179	ein P2Y ₁ -Rezeptorantagonist
DMSO	Dimethylsulfoxid	MS	Massenspektrometrie
- E -		MW	Mittelwert
EC	effektive Konzentration	- N -	
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i> (kodiert für LPA- /S1P-Rezeptoren, alte Nomenklatur)	NATyrPA	<i>N</i> -Acyl-Tyrosin-Phosphorsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	NASerPA	<i>N</i> -Acyl-Serin-Phosphorsäure
- G -		NFκB	ein Transkriptionsfaktor
G3P	Glycerol-3-Phosphat	- P -	
GTP	Guanosintriphosphat	P2Y _{1/12}	ADP-Rezeptoren
GP	Membranglykoproteine, z.B. GPIIb-IIIa	PA	Phosphatidsäure
		PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
		PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
		PC	Phosphatidylcholin
		PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
		PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
		PE	Phosphatidylethanolamin

PE	Polyethylen	- U -	
PLA	Phospholipase A		
PLD	Phospholipase D	U46619	ein Thromboxan Rezeptor Agonist
pM	pikomolar		
PP	Polypropylen	- V -	
PP2	ein Tyrosinkinasehemmer		
PPP	plättchenarmes Plasma	VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> (Transkriptionsfaktor)	VSMC	glatte Muskelzellen (<i>vascular smooth muscle cells</i>)
PRP	plättchenreiches Plasma	vWF	von Willebrand Faktor
PRIND	prolongiertes ischämisches neurologisches Defizit	- W -	
PS	Phosphatidylserin	WHO	Weltgesundheitsorganisation
PS	Polystyrol		
- S -		- Y -	
S1P	Sphingosin-1-Phosphat	YFLLRNP	ein Thrombin ähnliches Peptid
SD	Standardabweichung		
- T -			
TEA	Thrombendarteriektomie		
TF	<i>tissue factor</i>		
TGF	<i>tissue growth factor</i>		
TIA	transitorische ischämische Attacke		
TLC	Dünnschichtchromatographie		

9 Literaturverzeichnis

1. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 1989 Revision. 1992. Geneva, World Health Organization.
2. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.
3. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143-3421.
4. Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 2000;86:131-138.
5. Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, Barnes RI, Garg A. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* 2002;31:21-23.
6. Akbiyik F, Ray DM, Gettings KF, Blumberg N, Francis CW, Phipps RP. Human bone marrow megakaryocytes and platelets express PPARgamma, and PPARgamma agonists blunt platelet release of CD40 ligand and thromboxanes. *Blood* 2004;104:1361-1368.
7. Alexander JS, Patton WF, Christman BW, Cuiper LL, Haselton FR. Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol* 1998;274:H115-H122.
8. An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1998;273:7906-7910.
9. Andre F, Schartz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002;360:295-305.
10. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R, Arai H. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 2002;277:48737-48744.
11. Asselin J, Gibbins JM, Achison M, Lee YH, Morton LF, Farndale RW, Barnes MJ, Watson SP. A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1. *Blood* 1997;89:1235-1242.

12. Bachelot C, Cano E, Grelac F, Saleun S, Druker BJ, Levy-Toledano S, Fischer S, Rendu F. Functional implications of tyrosine protein phosphorylation in platelets. Simultaneous studies with different agonists and inhibitors. *Biochem J* 1992;284 (Pt 3):923-928.
13. Bacus JW, Watt S, Trobaugh FE, Jr. Clinical evaluation of a new electrical impedance instrument for counting platelets in whole blood. *Am J Clin Pathol* 1980;73:655-663.
14. Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B, Tigyi GJ. Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 2001;292:287-295.
15. Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-receptor, EDG 7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1999;274:27776-27785.
16. Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett* 2000;478:159-165.
17. Bauer M, Maschberger P, Quek L, Briddon SJ, Dash D, Weiss M, Watson SP, Siess W. Genetic and pharmacological analyses of involvement of Src-family, Syk and Btk tyrosine kinases in platelet shape change. Src-kinases mediate integrin alphaIIb beta3 inside-out signalling during shape change. *Thromb Haemost* 2001;85:331-340.
18. Bauer M, Retzer M, Wilde JI, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson SP, Siess W. Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 1999;94:1665-1672.
19. Bittman R, Swords B, Liliom K, Tigyi G. Inhibitors of lipid phosphatidate receptors: N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids. *J Lipid Res* 1996;37:391-398.
20. Bjerve KS, Daae LN, Bremer J. The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures. *Anal Biochem* 1974;58:238-245.
21. Blache D, Becchi M, Davignon J. Occurrence and biological effects of cholesteryl sulfate on blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1995;1259:291-296.
22. Blake RA, Schieven GL, Watson SP. Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 2 but not phospholipase C-gamma 1 in human platelets. *FEBS Lett* 1994;353:212-216.
23. Brandl R, Richter T, Haug K, Wilhelm MG, Maurer PC, Nathrath W. Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by

- immunocytochemical detection of the cell cycle-related antigen Ki-67. *Circulation* 1997;96:3360-3368.
24. Bunemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999;61:169-192.
 25. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996;81:1-41.
 26. Cazenave JP. In: Dawids S, ed. *Text procedures of the blood compatibility of biomaterials*, Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands; 1993:431-439.
 27. Chalmers J, MacMahon S, Mancia G, Whitworth J, Beilin L, Hansson L, Neal B, Rodgers A, Ni MC, Clark T. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization. *Clin Exp Hypertens* 1999;21:1009-1060.
 28. Choy PC, Siow YL, Mymin D, O K. Lipids and atherosclerosis. *Biochem Cell Biol* 2004;82:212-224.
 29. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* 2002;54:265-269.
 30. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits. *Mol Cell Biol* 2002;22:6921-6929.
 31. Corti R, Farkouh ME, Badimon JJ. The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *Am J Med* 2002;113:668-680.
 32. Corton JC, Anderson SP, Stauber A. Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:491-518.
 33. Croset M, Brossard N, Polette A, Lagarde M. Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 2000;345 Pt 1:61-67.
 34. Cross MJ, Roberts S, Ridley AJ, Hodgkin MN, Stewart A, Claesson-Welsh L, Wakelam MJ. Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D. *Curr Biol* 1996;6:588-597.
 35. Dahlback B. Blood coagulation. *Lancet* 2000;355:1627-1632.

36. Danese S, de la MC, Sturm A, Vogel JD, West GA, Strong SA, Katz JA, Fiocchi C. Platelets trigger a CD40-dependent inflammatory response in the microvasculature of inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology* 2003;124:1249-1264.
37. de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 1999;41:443-449.
38. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:6306-6310.
39. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997;337:408-416.
40. Dicorleto PE, Michael A, Gimbrone JR. Vascular endothelium. In: Fuster V, Ross R and Topol EJ, ed. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996:387-399.
41. Diep QN, Schiffrin EL. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001;38:249-254.
42. Drayer NM, Lieberman S. Isolation of cholesterol sulfate from human aortas and adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1967;27:136-139.
43. Du X, Ginsberg MH. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb Haemost* 1997;78:96-100.
44. Dunlop ME, Larkins RG. Pancreatic islets synthesize phospholipids de novo from glucose via acyl-dihydroxyacetone phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;132:467-473.
45. Engelmann B, Luther T, Muller I. Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 2003;89:3-8.
46. English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, Brindley DN, Garcia JG. Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res* 1999;8:627-634.
47. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 2000;448:121-138.
48. Essler M, Retzer M, Bauer M, Heemskerk JW, Aepfelbacher M, Siess W. Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells

- through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:30361-30364.
49. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 1999;5:1199-1202.
 50. Faggiotto A, Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 1984;4:341-356.
 51. Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984;4:323-340.
 52. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1049-1056.
 53. Fischer DJ, Nusser N, Virag T, Yokoyama K, Wang D, Baker DL, Bautista D, Parrill AL, Tigyi G. Short-chain phosphatidates are subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2001;60:776-784.
 54. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ, Jr., Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chintala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001;107:1591-1598.
 55. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated. *Cell* 1995;80:919-927.
 56. Fueller M. Einwirkungen von Lysophosphatidsäure und Sphingosin-1-Phosphat auf humane Mono-Mac-Zellen. *Dissertation aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten*, Ludwig-Maximilians-Universität München 2002:81-93.
 57. Fueller M, Wang dA, Tigyi G, Siess W. Activation of human monocytic cells by lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Cell Signal* 2003;15:367-375.
 58. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992;326:242-250.
 59. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992;326:310-318.

60. Gachet C. Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonists. *Ann Med* 2000;32 Suppl 1:15-20.
61. Gaudette DC, Holub BJ. Effect of genistein, a tyrosine kinase inhibitor, on U46619-induced phosphoinositide phosphorylation in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:238-242.
62. Gawaz M. Thrombozyten und primäre Hämostase. In: *Das Blutplättchen*. Stuttgart: Thieme Verlag; 1999:4-24.
63. Gennero I, Xuereb JM, Simon MF, Girolami JP, Bascands JL, Chap H, Boneu B, Sie P. Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca⁺⁺ of human adult vascular smooth muscle cells in culture. *Thromb Res* 1999;94:317-326.
64. Gerrard JM, Robinson P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta* 1989;1001:282-285.
65. Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res* 1999;19:3439-3445.
66. Goetzl EJ, Kong Y, Mei B. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax. *J Immunol* 1999;162:2049-2056.
67. Goetzl EJ, Lee H, Azuma T, Stossel TP, Turck CW, Karliner JS. Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 2000;275:14573-14578.
68. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
69. Gueguen G, Gaige B, Grevy JM, Rogalle P, Bellan J, Wilson M, Klaebe A, Pont F, Simon MF, Chap H. Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry* 1999;38:8440-8450.
70. Hama K, Bandoh K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation. *FEBS Lett* 2002;523:187-192.
71. Hamet P, Skuherska R, Pang SC, Tremblay J. Abnormalities of platelet function in hypertension and diabetes. *Hypertension* 1985;7:II135-II142.
72. Haseruck N, Erl W, Pandey D, Tigyi G, Ohlmann P, Ravanat C, Gachet C, Siess W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* 2004;103:2585-2592.

73. Hayashi K, Takahashi M, Nishida W, Yoshida K, Ohkawa Y, Kitabatake A, Aoki J, Arai H, Sobue K. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res* 2001;89:251-258.
74. Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid. *J Cell Biol* 1996;135:1071-1083.
75. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2003;348:1104-1111.
76. Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276:10423-10431.
77. Hirsh J. Hyperactive platelets and complications of coronary artery disease. *N Engl J Med* 1987;316:1543-1544.
78. Hooks SB, Santos WL, Im DS, Heise CE, Macdonald TL, Lynch KR. Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent. *J Biol Chem* 2001;276:4611-4621.
79. Imamura F, Horai T, Mukai M, Shinkai K, Sawada M, Akedo H. Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:497-503.
80. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* 2004;73:321-354.
81. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:775-789.
82. Kai M, Wada I, Imai S, Sakane F, Kanoh H. Cloning and characterization of two human isozymes of Mg²⁺-independent phosphatidic acid phosphatase. *J Biol Chem* 1997;272:24572-24578.
83. Kamido H, Eguchi H, Ikeda H, Imaizumi T, Yamana K, Hartvigsen K, Ravandi A, Kuksis A. Core aldehydes of alkyl glycerophosphocholines in atheroma induce platelet aggregation and inhibit endothelium-dependent arterial relaxation. *J Lipid Res* 2002;43:158-166.
84. Keely PJ, Parise LV. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem* 1996;271:26668-26676.
85. Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating

- nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004;5:104-112.
86. Kjeldsen SE, Rostrup M, Gjesdal K, Eide I. The epinephrine-blood platelet connection with special reference to essential hypertension. *Am Heart J* 1991;122:330-336.
87. Kowalska MA, Ratajczak J, Hoxie J, Brass LF, Gewirtz A, Poncz M, Ratajczak MZ. Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol* 1999;104:220-229.
88. Lapetina EG, Billah MM, Cuatrecasas P. The phosphatidylinositol cycle and the regulation of arachidonic acid production. *Nature* 1981;292:367-369.
89. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 1999;282:2340-2346.
90. Lee H, Lin CI, Liao JJ, Lee YW, Yang HY, Lee CY, Hsu HY, Wu HL. Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C1657-C1666.
91. Leon C, Freund M, Ravanat C, Baurand A, Cazenave JP, Gachet C. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* 2001;103:718-723.
92. Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 1999;104:1731-1737.
93. Leung DW, Tompkins CK, White T. Molecular cloning of two alternatively spliced forms of human phosphatidic acid phosphatase cDNAs that are differentially expressed in normal and tumor cells. *DNA Cell Biol* 1998;17:377-385.
94. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000;247:349-358.
95. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
96. Liggett SB, Ostrowski J, Chesnut LC, Kurose H, Raymond JR, Caron MG, Lefkowitz RJ. Sites in the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor confer short term agonist-promoted desensitization. Evidence for a receptor kinase-mediated mechanism. *J Biol Chem* 1992;267:4740-4746.
97. Liliom K, Bittman R, Swords B, Tigyi G. N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids are selective competitive antagonists of the lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 1996;50:616-623.

98. Lincoff AM. Important triad in cardiovascular medicine: diabetes, coronary intervention, and platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 2003;107:1556-1559.
99. Lind SE, Smith DB, Janmey PA, Stossel TP. Depression of gelsolin levels and detection of gelsolin-actin complexes. *Am Rev Respir Dis* 1988;138:429-434.
100. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-241.
101. Lynch KR. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:70-71.
102. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999;99:348-353.
103. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 1978;87:206-210.
104. Maschberger P, Bauer M, Baumann-Siemons J, Zangl KJ, Negrescu EV, Reininger AJ, Siess W. Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor Src family and Syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem* 2000;275:19159-19166.
105. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-896.
106. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:131-136.
107. Merten M, Dong JF, Lopez JA, Thiagarajan P. Cholesterol sulfate: a new adhesive molecule for platelets. *Circulation* 2001;103:2032-2034.
108. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:582-591.
109. Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR, Zondag GC. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:168-173.
110. Moons AH, Levi M, Peters RJ. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 2002;53:313-325.

111. Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001;86:66-74.
112. Motohashi K, Shibata S, Ozaki Y, Yatomi Y, Igarashi Y. Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FEBS Lett* 2000;468:189-193.
113. Munnik T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* 2001;6:227-233.
114. Munnik T, de Vrije T, Irvine RF, Musgrave A. Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J Biol Chem* 1996;271:15708-15715.
115. Munnik T, Irvine RF, Musgrave A. Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* 1998;1389:222-272.
116. Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, Sobel ME, Liotta LA, Stracke ML. cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1994;269:30479-30484.
117. Navab M, Hama SY, Reddy ST, Ng CJ, Van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM, Ready ST. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 2002;13:363-372.
118. Negrescu EV, de Quintana KL, Siess W. Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. Rapid stimulation of tyrosine phosphorylation of novel protein substrates through an integrin- and (Ca²⁺)-independent mechanism. *J Biol Chem* 1995;270:1057-1061.
119. Nieswandt B, Schulte V, Zywiets A, Gratacap MP, Offermanns S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIbeta 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 2002;277:39493-39498.
120. Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA, van Hinsbergh VW. Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E127-E133.
121. Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 2003;278:25600-25606.
122. Offermanns S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. *Biol Chem* 2000;381:389-396.
123. Opper C, Clement C, Schwarz H, Krappe J, Steinmetz A, Schneider J, Wesemann W. Increased number of high sensitive platelets in hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, and after incubation with cholesterol. *Atherosclerosis* 1995;113:211-217.

124. Padilla J, Leung E, Phipps RP. Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists. *Clin Immunol* 2002;103:22-33.
125. Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS. Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;64:1-10.
126. Palmetshofer A, Robson SC, Nehls V. Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb Haemost* 1999;82:1532-1537.
127. Parrill AL, Wang D, Bautista DL, Van Brocklyn JR, Lorincz Z, Fischer DJ, Baker DL, Liliom K, Spiegel S, Tigyi G. Identification of Edg1 receptor residues that recognize sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 2000;275:39379-39384.
128. Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP. LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol* 1999;19:8326-8334.
129. Patil S, Newman DK, Newman PJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood* 2001;97:1727-1732.
130. Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, Siess W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J* 2005;19:898-909.
131. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991;65:359-362.
132. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12367-12371.
133. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1999;274:11924-11929.
134. Retzer M, Siess W, Essler M. Mildly oxidised low density lipoprotein induces platelet shape change via Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin light chain and moesin. *FEBS Lett* 2000;466:70-74.
135. Rizza C, Leitinger N, Yue J, Fischer DJ, Wang DA, Shih PT, Lee H, Tigyi G, Berliner JA. Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest* 1999;79:1227-1235.

136. Roberts R, Sciorra VA, Morris AJ. Human type 2 phosphatidic acid phosphohydrolases. Substrate specificity of the type 2a, 2b, and 2c enzymes and cell surface activity of the 2a isoform. *J Biol Chem* 1998;273:22059-22067.
137. Roffi M, Chew DP, Mukherjee D, Bhatt DL, White JA, Heeschen C, Hamm CW, Moliterno DJ, Califf RM, White HD, Kleiman NS, Theroux P, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors reduce mortality in diabetic patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:2767-2771.
138. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276:37731-37734.
139. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809.
140. Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis. *Science* 1976;193:1094-1100.
141. Rother E, Brandl R, Baker DL, Goyal P, Gebhard H, Tigyi G, Siess W. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2003;108:741-747.
142. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-1234.
143. Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y, Tigyi G. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem* 2002;277:21197-21206.
144. Sano T, Ohyama K, Yamano Y, Nakagomi Y, Nakazawa S, Kikyo M, Shirai H, Blank JS, Exton JH, Inagami T. A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A. *J Biol Chem* 1997;272:23631-23636.
145. Sardar VM, Bautista DL, Fischer DJ, Yokoyama K, Nusser N, Virag T, Wang DA, Baker DL, Tigyi G, Parrill AL. Molecular basis for lysophosphatidic acid receptor antagonist selectivity. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:309-317.
146. Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 1999;401:133-141.
147. Schumacher KA, Classen HG, Spath M. Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids. *Thromb Haemost* 1979;42:631-640.
148. Schumaker VN, Puppione DL. Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol* 1986;128:155-170.
149. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;69:58-178.

150. Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:204-215.
151. Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem* 2004;92:1086-1094.
152. Siess W, Weber PC, Lapetina EG. Activation of phospholipase C is dissociated from arachidonate metabolism during platelet shape change induced by thrombin or platelet-activating factor. Epinephrine does not induce phospholipase C activation or platelet shape change. *J Biol Chem* 1984;259:8286-8292.
153. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6931-6936.
154. Simon MF, Chap H, Douste-Blazy L. Platelet aggregating activity of lysophosphatidic acids is not related to their calcium ionophore properties. *FEBS Lett* 1984;166:115-119.
155. Simpson CM, Itabe H, Reynolds CN, King WC, Glomset JA. Swiss 3T3 cells preferentially incorporate sn-2-arachidonoyl monoacylglycerol into sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylinositol. *J Biol Chem* 1991;266:15902-15909.
156. Smyth SS, Sciorra VA, Sigal YJ, Pamuklar Z, Wang Z, Xu Y, Prestwich GD, Morris AJ. Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem* 2003;278:43214-43223.
157. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995;92:1355-1374.
158. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1992;267:2524-2529.
159. Subbanagounder G, Leitinger N, Schwenke DC, Wong JW, Lee H, Rizza C, Watson AD, Faull KF, Fogelman AM, Berliner JA. Determinants of bioactivity of oxidized phospholipids. Specific oxidized fatty acid groups at the sn-2 position. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2248-2254.
160. Sugiura T, Tokumura A, Gregory L, Nouchi T, Weintraub ST, Hanahan DJ. Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acid with human platelets: comparison with platelet activating factor. *Arch Biochem Biophys* 1994;311:358-368.

161. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, . A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997;386:292-296.
162. Terres W, Becker P, Rosenberg A. Changes in cardiovascular risk profile during the cessation of smoking. *Am J Med* 1994;97:242-249.
163. Terres W, Weber K, Kupper W, Bleifeld W. Age, cardiovascular risk factors and coronary heart disease as determinants of platelet function in men. A multivariate approach. *Thromb Res* 1991;62:649-661.
164. Thompson FJ, Clark MA. Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase. *Biochem J* 1994;300 (Pt 2):457-461.
165. Tigyi G, Miledi R. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 1992;267:21360-21367.
166. Tigyi G, Parrill AL. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res* 2003;42:498-526.
167. Timpl R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biol* 1994;14:275-281.
168. Tokumura A, Fukuzawa K, Tsukatani H. Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids* 1978;13:572-574.
169. Tokumura A, Iimori M, Nishioka Y, Kitahara M, Sakashita M, Tanaka S. Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta. *Am J Physiol* 1994;267:C204-C210.
170. Tokumura A, Sinomiya J, Kishimoto S, Tanaka T, Kogure K, Sugiura T, Satouchi K, Waku K, Fukuzawa K. Human platelets respond differentially to lysophosphatidic acids having a highly unsaturated fatty acyl group and alkyl ether-linked lysophosphatidic acids. *Biochem J* 2002;365:617-628.
171. Tokumura A, Yoshida J, Maruyama T, Fukuzawa K, Tsukatani H. Platelet aggregation induced by ether-linked phospholipids. 1. Inhibitory actions of bovine serum albumin and structural analogues of platelet activating factor. *Thromb Res* 1987;46:51-63.
172. Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschield CC, Argraves WS. The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* 1995;270:19458-19464.
173. Trip MD, Cats VM, van Capelle FJ, Vreken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1990;322:1549-1554.

174. Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 1992;11:433-439.
175. Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 2002;158:227-233.
176. van den Bosch H. Phosphoglyceride metabolism. *Annu Rev Biochem* 1974;43:243-277.
177. van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability. *Cardiovasc Res* 1999;41:334-344.
178. Vancura A, Carroll MA, Haldar D. A lysophosphatidic acid-binding cytosolic protein stimulates mitochondrial glycerophosphate acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;175:339-343.
179. Vancura A, Haldar D. Regulation of mitochondrial and microsomal phospholipid synthesis by liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 1992;267:14353-14359.
180. Virag T, Elrod DB, Liliom K, Sardar VM, Parrill AL, Yokoyama K, Durgam G, Deng W, Miller DD, Tigyi G. Fatty alcohol phosphates are subtype-selective agonists and antagonists. *Mol Pharmacol* 2003;63:1032-1042.
181. Vogt W. Pharmacologically active lipidsoluble acids of natural occurrence. *Nature* 1957;179:300-304.
182. Vogt W. The chemical nature of Darmstoff. *J Physiol* 1957;137:154-167.
183. Vouret-Craviari V, Boquet P, Pouyssegur J, Obberghen-Schilling E. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell* 1998;9:2639-2653.
184. Waggoner DW, Gomez-Munoz A, Dewald J, Brindley DN. Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem* 1996;271:16506-16509.
185. Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, Liliom K, Tigyi G, Parrill AL. A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J Biol Chem* 2001;276:49213-49220.
186. Watson S, Berlanga O, Best D, Frampton J. Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 2000;11:252-258.

187. Weissberg PL, Bennett MR. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:1928-1929.
188. Wissing JB, Behrbohm H. Diacylglycerol pyrophosphate, a novel phospholipid compound. *FEBS Lett* 1993;315:95-99.
189. Wissing JB, Kornak B, Funke A, Riedel B. Phosphatidate Kinase, A Novel Enzyme in Phospholipid Metabolism (Characterization of the Enzyme from Suspension-Cultured *Catharanthus roseus* Cells). *Plant Physiol* 1994;105:903-909.
190. Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH. Integrin activation. *Thromb Haemost* 2001;86:316-323.
191. Xu J, Love LM, Singh I, Zhang QX, Dewald J, Wang DA, Fischer DJ, Tigyi G, Berthiaume LG, Waggoner DW, Brindley DN. Lipid phosphate phosphatase-1 and Ca²⁺ control lysophosphatidate signalling through EDG-2 receptors. *J Biol Chem* 2000;275:27520-27530.
192. Yokoyama K, Baker DL, Virag T, Liliom K, Byun HS, Tigyi G, Bittman R. Stereochemical properties of lysophosphatidic acid receptor activation and metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:295-308.
193. Yoshida K, Nishida W, Hayashi K, Ohkawa Y, Ogawa A, Aoki J, Arai H, Sobue K. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid in vivo. *Circulation* 2003;108:1746-1752.
194. Zhang C, Baker DL, Yasuda S, Makarova N, Balazs L, Johnson LR, Marathe GK, McIntyre TM, Xu Y, Prestwich GD, Byun HS, Bittman R, Tigyi G. Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation. *J Exp Med* 2004;199:763-774.
195. Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J* 2001;15:1264-1266.
196. Zheng Y, Kong Y, Goetzl EJ. Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *J Immunol* 2001;166:2317-2322.
197. Zimmerman TS, Dent JA, Ruggeri ZM, Nannini LH. Subunit composition of plasma von Willebrand factor. Cleavage is present in normal individuals, increased in IIA and IIB von Willebrand disease, but minimal in variants with aberrant structure of individual oligomers (types IIC, IID, and IIE). *J Clin Invest* 1986;77:947-951.

Eigene Veröffentlichungen

1. Originalarbeiten:

Rother E., Brandl R., Baker D.L., Goyal P., Gebhard H., Tigyi G., Siess W. (2003) "Subtype selective antagonists of lysophosphatidic acid-receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques", *Circulation* (2003) Aug 12; 108(6): 741-747

Penz S., Reininger A.J., Brandl R., Goyal P., Rabie T., Bernlochner I., Rother E., Goetz C., Engelmann B., Smethurst P.A., Ouwehand W.H., Farndale R., Nieswandt B., Siess W. „Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI“, *FASEB J.* (2005) Jun; 19(8):898-909.

2. Kongressbeiträge:

a) Vorträge:

Rother E., Brandl R., Baker D.L., Tigyi G., Siess W. "LPA in the core region of atherosclerotic plaques induces platelet shape change through the stimulation of LPA₁ and LPA₃ receptors", XVII European Platelet Meeting, Kloster Eberbach, Germany, October 10-12, 2002, *Platelets* (2002), 13, 499

Rother E., Brandl R., Baker D.L., Tigyi G., Siess W. "Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic acid-receptors inhibit platelet shape change induced by mildly-oxidized LDL and the lipid core of atherosclerotic plaques", 75. Congress of the American Heart Association, Chicago, USA, Nov 17-20 2002, *Circulation* (2002), 106, II-43

b) Poster:

Rother, E., Fischer, D., Nusser, N., Tigyi, G., Siess, W. "Diacyl-(8:0)-Glyceropyrophosphate inhibits Lysophosphatidic Acid induced Platelet Activation", Biolog 2000, Kongress der Muenchner Biowissenschaften, 18.11.2000

Rother, E., Fischer, D., Nusser, N., Tigyi, G. and Siess, W. "Diacyl-(8:0)-glyceropyrophosphate, a new Edg-receptor antagonist, blocks LPA induced shape change in human platelets", XV Annual European Symposium on Blood Platelets, Bischenberg, France, Oct 19-21, 2000, *Platelets* (2001), 12, 54

Rother, E., Sandmann, G., Haserück, N., Fischer, D., Nusser, N., Sardar, V., Miller, D., Tigyi, G., Siess, W. "Monoalkyl-(18:0)- glycerodiphosphate and diacyl-(8:0)- glyceropyrophosphate inhibit lysophosphatidic acid induced platelet activation." XVIII. Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, France, July 6-12, 2001, *Thromb Haemostas.* (2001) Suppl.86/1

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Siess danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Seine stete Bereitschaft zur Diskussion und seine freundliche Unterstützung bei der Publikation der Ergebnisse habe ich besonders geschätzt.

Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber gilt mein Dank für die guten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten.

Herrn Prof. Dr. med. R. Brandl, Chefarzt der Gefäßchirurgie am Städtischen Krankenhaus München-Schwabing, vormals leitender Oberarzt der Gefäßchirurgie am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München, danke ich für die Bereitstellung der Plaque-Präparate und der Blutproben von Patienten.

Herrn Prof. Tigyi, MD, PhD und D.L. Baker, PhD, Department of Physiology, The University of Tennessee Health Science Center, Memphis, USA, danke ich für die Bereitstellung zahlreicher Phospholipide und die umfangreichen LC-MS-Analysen der Plaqueproben.

Besonders möchte ich mich bei Frau Carola Laudano und Frau Nicole Wilke bedanken für die Einarbeitung in die Methodik und tatkräftige Hilfe bei zahlreichen Experimenten.

Schließlich gilt mein Dank den zahlreichen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, die zu einem wirklich angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben und mir bei Schwierigkeiten stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Name: Frank Enno Rother

Geburtsdatum: 13.11.1975

Geburtsort: Hansestadt Hamburg

Schulbildung: Grundschule Eichenau 1982-1986
Gymnasium Puchheim 1986-1995
Abschluss: Abitur

Wehrdienst: 01/96 Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter,
Teilnehmer am 1. Sanitätsoffizierlehrgang der Luftwaffe,
Offizierschule Fürstenfeldbruck

Hochschulstudium: 11/96 – 09/98 Studium der Humanmedizin an der Universität
Regensburg
10/98 – 05/03 Studium der Humanmedizin an der Technischen
Universität München
Praktisches Jahr am Städtischen Krankenhaus München-Bogenhausen
(Innere Medizin), am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München
(Chirurgie) und am Klinikum Rechts der Isar (Psychosomatische
Medizin)
Abschluss: Ärztliche Prüfung

Berufliche Tätigkeit: 05/03 – 05/05 Arzt im Praktikum und Assistenzarzt am
Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Akademisches Krankenhaus der
Universität Ulm (Abteilung Innere Medizin, Leiter: Prof. R. Schick)
10/04 Vollapprobation als Arzt
Seit 06/05 Truppenarzt in Pöcking (Fernmeldeschule der Bundeswehr)
11/05 – 01/06 Bundeswehrauslandseinsatz als Notarzt im 3. Kontingent
EUFOR, Rajlovac, Bosnien