

**Identifikation von Lysophosphatidsäure
als Thrombozyten-aktivierende Substanz
milde oxidierter Lipoproteine**

Konrad Josef Zangl

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

**Identifikation von Lysophosphatidsäure
als Thrombozyten-aktivierende Substanz
milde oxidierten Lipoproteine**

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

vorgelegt von:
Konrad Josef Zangl
aus Freising
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Siess
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. E. Hiller
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. K. Parhofer Prof. Dr. med. B. Engelmann
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	27. November 2003

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
A. Grundlagen	1
I. Einleitung	1
II. Stand der Forschung	2
1. Die Lipoproteine LDL und HDL	2
2. Lipid- und Lipoproteinoxidation	5
3. Thrombozyten und Arteriosklerose	8
4. Lysophosphatidsäure und ihre biologische Wirkung	13
5. Thrombozytäre Signaltransduktion und Desensibilisierung von G-Proteinen	19
6. Die HDL-assoziierten Enzyme Paraoxonase und PAF-Azetylhydrolase	26
III. Fragestellung und Zielsetzung	28
B. Materialien und Methoden	29
I. Materialien	29
II. Präparation und Modifikation der Lipoproteine	31
1. Präparation nativer Lipoproteine	31
2. Modifikation der Lipoproteine	33
3. Physikochemische Eigenschaften der modifizierten Lipoproteine	33
4. Enzymhemmungen	34
III. <i>In-vitro</i> -Studien an Thrombozyten	35
1. Thrombozytenpräparation	35
2. Thrombozytärer Gestaltwandel und Aggregation	36
3. Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskopie	39
4. Trennung der Thrombozytenproteine und Messung der Proteintyrosinphosphorylierung	40
5. Analyse der Ergebnisse	40
IV. Quantifizierung der Lysophosphatidsäuren in Lipoproteinen	41
1. Sequentielle Lipidextraktion	41
2. Dünnschichtchromatographie	43
3. Biologische Aktivitätsmessung von Extrakten und Eluaten	44
4. Recoverymessungen mit tritiierter Lysophosphatidsäure	45
5. Biologische Aktivitätsmessung anderer Lipidfraktionen	46

C. Ergebnisse	47
I. Lipoprotein-Eigenwirkungen auf Thrombozyten	47
1. Eigenwirkungen nativer Lipoproteine	47
2. Einfluß der Präparationsmethode auf die Lipoproteineigenschaften	48
3. Agonistische Wirkungen milde oxidierter Lipoproteine	49
4. Vergleich mit anderen Verfahren der Lipoproteinmodifikation	54
II. Hemmeffekte und Interaktionen	58
1. Effekte nativer Lipoproteine	58
2. Hemmung HDL-assoziiierter Enzyme	64
III. Charakterisierung der mox-Lpp-induzierten Thrombozytenaktivierung auf Rezeptorebene: Desensibilisierungsassay und Rezeptorantagonisten	66
1. Entwicklung eines Desensibilisierungsassays gewaschener Plättchen	66
2. Kreuzdesensibilisierung zwischen modifizierten Lipoproteinen und Lysophosphatidsäure	70
3. LPA-Rezeptorantagonisten	79
IV. Bestimmung der Lysophosphatidsäure in Lipoproteinen	84
1. Biologische Aktivitätsmessung von Extrakten und Eluaten	84
2. Biologische Aktivität anderer Lipidfraktionen	88
3. Versuche mit LPA-angereicherten Lipoproteinen	89
D. Diskussion	91
I. Methodendiskussion	91
1. Mox-LDL als <i>in-vitro</i> -Modell der atheromatösen Läsion	91
2. Desensibilisierungsassay mit gewaschenen Thrombozyten	92
3. Quantifizierung der Lysophosphatidsäure in Lipoproteinen	93
4. Lysophosphatidsäure und LPA-ähnliche Lipide	95
II. Lysophosphatidsäure als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen?	98
1. LPA-Entstehung durch Oxidation von Lipoproteinen	98
2. LPA stellt die Thrombozyten-aktivierende Substanz oxidierter Lipoproteine dar	100
3. Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für die Situation <i>in vivo</i>	100
III. LDL und HDL: Gegenspieler mit Gemeinsamkeiten	104
IV. Perspektive	106
E. Zusammenfassung	107
F. Literaturverzeichnis	108
Anhang: Publikationsliste, Danksagung, Lebenslauf	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzgl.	bezüglich
DC	Dünnschichtchromatographie (= TLC)
EC ₅₀	Konzentration halbmaximaler Agonistenwirkung
ev.	eventuell
Gw.	Gestalt-, Formwandel von Thrombozyten (»Shape-change«, s.c.)
HDL	High-density lipoprotein = Lipoprotein hoher Dichte
HDL ₂	Lipoprotein hoher Dichte Typ 2
HDL ₃	Lipoprotein hoher Dichte Typ 3
[³ H]-LPA	tritiierte Lysophosphatidsäure
IC ₅₀	Konzentration halbmaximaler Hemmstoffwirkung
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein = Lipoprotein niedriger Dichte
LDL _K	Lipoprotein niedriger Dichte aus der Kurzzeitpräparation
LDL _L	Lipoprotein niedriger Dichte aus der Langzeitpräparation
Lpp	Lipoprotein(e)
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin = Lysolezithin
min.	Minute(n)
mm-Lpp	minimal modifiziertes Lipoprotein
mox-Lpp	milde oxidiertes Lipoprotein
MW ± SA	Mittelwert ± Standardabweichung
nat-Lpp	native Lipoprotein
NPSerPA	N-Palmitoyl-Serin Phosphorsäure (LPA-Antagonist)
NPTyrPA	N-Palmitoyl-Tyrosin Phosphorsäure (LPA-Antagonist)
o.D.	optische Dichte
ox ₁ -Lpp	oxidiertes Lipoprotein, Methode nach Takahashi (Oxidation mit 0,8 g Protein/l)
ox ₅ -Lpp	stark oxidiertes Lipoprotein, Oxidation bei stärkerer Verdünnung (0,4 g Protein/l)
PA	Phosphatidsäure
PAF	Platelet activating factor = Thrombozyten-aktivierender Faktor
PAF-AH	PAF-Azetylhydrolase
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PON	Paraoxonase
PPP	plättchenarmes Plasma
S-1-P	Sphingosin-1-Phosphat
sek.	Sekunde(n)
SIN-Lpp	mit SIN-1 (Sydnonimin) oxidiertes Lipoprotein
SM	Sphingomyelin
Tab.	Tabelle
VLDL	Very-low-density lipoprotein = Lipoprotein sehr niedriger Dichte
vs.	versus (bei Gegenüberstellungen)

Für weitere Abkürzungen siehe auch Materialienliste

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur nativer Lipoproteine	S. 7
Abb. 2: Strukturformeln der Lysophosphatidsäure und ihres Antagonisten NPTyrPA	S. 18
Abb. 3: Zentrale Elemente der LPA-induzierten Signalkaskade	S. 22
Abb. 4: Schema der Rezeptorinaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)	S. 25
Abb. 5: Lipoproteinauftrennung (Kurzzeitpräparation)	S. 32
Abb. 6: Zeitlicher Ablauf eines Desensibilisierungsversuches	S. 37
Abb. 7: Grad der Inkorporation von Lysophosphatidsäure in natives LDL	S. 39
Abb. 8: Schritte der sequentiellen Lipidextraktion und der nachfolgenden Quantifizierungsmethoden	S. 45
Abb. 9: Durch mox-LDL und mox-HDL induzierter thrombozytärer Formwandel	S. 50
Abb. 10: Beurteilung der Plättchenmorphologie: Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop	S. 52
Abb. 11: Untersuchungen zur Aggregation: mox-LDL _k und mox-HDL ₃	S. 53
Abb. 12: Hemmung des mox-LDL-induzierten Gestaltwandels durch nat-HDL	S. 59
Abb. 13: Dosisabhängigkeit des Hemmeffektes von nat-Lpp auf den mox-Lpp-induzierten Formwandel	S. 60f
Abb. 14: Hemmeffekt von nat-HDL auf die mox-LDL-induzierte Proteintyrosinphosphorylierung	S. 62
Abb. 15: Hemmung der mox-LDL-induzierten Aggregation durch nat-HDL	S. 63
Abb. 16: Arbeitshypothese zur Wirkung der HDL-assoziierten Enzyme Paraoxonase (PON) bzw. PAF-Azetylhydrolase (PAF-AH)	S. 64
Abb. 17: Keine Desensibilisierung des mox-LDL-induzierten thrombozytären Formwandels durch Lysophosphatidylcholin (LPC)	S. 70
Abb. 18: Phänomen der Desensibilisierung (Aggregometermessungen, Gestaltwandel)	S. 71f
Abb. 19: Proteintyrosinphosphorylierung induziert durch mox-HDL, mox-LDL und LPA: Kinetik und Desensibilisierung	S. 73f
Abb. 20: Desensibilisierung bei ox-LDL (Aggregometermessungen, Gestaltwandel)	S. 78
Abb. 21: Phänomen der Desensibilisierung (Aggregometermessungen, Aggregation)	S. 79
Abb. 22: Effekt von Suramin auf isolierte Thrombozyten	S. 80
Abb. 23: Hemmung der durch mox-LDL induzierten Thrombozytenantwort durch den LPA-Rezeptorantagonisten NPTyrPA (Aggregometer)	S. 82
Abb. 24: Hemmung der durch mox-LDL induzierten Proteintyrosinphosphorylierung in Thrombozyten durch LPA-Rezeptorantagonisten	S. 83
Abb. 25: LPA-Quantifizierung mittels biologischer Aktivitätsmessung	S. 86
Abb. 26: Mögliche Funktionen von oxidierten Lipoproteinen und darin enthaltener Lysophosphatidsäure in der Pathogenese von Arteriosklerose und Thrombose	S. 103

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Gegenüberstellung von LDL und HDL	S. 3
Tab. 2:	Bei der Aktivierung von Thrombozyten freigesetzte Agonisten	S. 10
Tab. 3:	Biologische Effekte von Lysophosphatidsäure	S. 15
Tab. 4:	LPA-Rezeptoren, nachgeschaltete G-Proteine, Phänotyp Rezeptor-defizienter Mäuse	S. 17
Tab. 5:	Serumlipide der Blutspenderinnen und Blutspender	S. 32
Tab. 6:	Gegenüberstellung der Rf-Werte von Lysophosphatidsäure und abzugrenzenden Lipiden in der Dünnschichtchromatographie (DC)	S. 43
Tab. 7:	Vergleich der Lipoproteinpräparationen mittels Ultrazentrifugation	S. 49
Tab. 8:	Gegenüberstellung von zentralen physikochemischen Parametern verschiedener nativer und modifizierter Lipoproteine	S. 55f
Tab. 9:	Typisches Beispiel für die Induktion eines thrombozytären Formwandels durch verschieden oxidierte LDL-Spezies	S. 57
Tab. 10:	Höhere Dosen mox-Lpp führen gewöhnlich zur kompletten Desensibilisierung	S. 68
Tab. 11:	Desensibilisierbarkeit der Plättchenantwort durch zweimalige Gabe von Lipoproteinsuspensionen	S. 69
Tab. 12:	Desensibilisierung der Plättchenantwort auf modifizierte Lipoproteine und LPA	S. 77
Tab. 13:	Hemmeffekt von Suramin auf unterschiedliche Plättchenagonisten	S. 81
Tab. 14:	Hemmung des mox-Lpp-induzierten Formwandels durch LPA-Rezeptorantagonisten	S. 84
Tab. 15:	Biologische Aktivität von butanolischen Extrakten und LPA-Eluaten	S. 87
Tab. 16:	Aktivität der einzelnen Lipidfraktionen aus nativem und milde oxidiertem LDL	S. 88
Tab. 17:	Prozentualer Anteil der Lipidgruppen in HDL ₃ und ihre Veränderung während der milden Oxidation	S. 89
Tab. 18:	Dosis-Wirkungsverhältnis bei LPA-angereichertem LDL; Vergleich mit freier LPA und mox-LDL	S. 90

A. Grundlagen

I. Einleitung

»... Ich habe, um Ihnen diese Schwierigkeiten in einem wichtigen und zugleich vielfach mißverstandenen Prozesse etwas klarer zu machen, eine Reihe von Präparaten von eigentlich atheromatösen Zuständen der Arterien angefertigt. Gerade bei diesen ist die Confusion ... vielleicht am größten gewesen. Zu keiner Zeit im Laufe dieses Jahrhunderts hat man sich vollständig geeinigt, was man unter dem Ausdrücke der atheromatösen Veränderung an einem Gefäße verstehen wolle. ...«

Rudolf Virchow, 1858

Gut 145 Jahre nach dieser Klage R. Virchows herrscht in der medizinischen Forschung immer noch verblüffend viel »Confusion« ob der Absenz eines schlüssigen Modells der Arterioskleroseentstehung (Arteriosklerose, von αρτηρία: Schlagader und σκληρος: hart, trocken). Dies ist um so erstaunlicher, als die arteriosklerotisch bedingten Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit inzwischen 48 % die häufigste Todesursache in Deutschland (Statist. Bundesamt 1996) sowie den anderen Industriestaaten darstellen.

Insbesondere die von Virchow erwähnte Variante der Atheromatose (Atherom, von αθηρη: Mehlbrei, Grütze) gilt als Ursache akuter arterieller Thrombosen bzw. Thromboembolien mit oft letalen Verlaufsformen, etwa bei schweren Myokardinfarkten, bzw. mit der Folge erheblicher Behinderungen, beispielsweise nach apoplektisch-ischämischen Insulten. Allgemein unter Arteriosklerose subsumiert man nach heute gängiger Auffassung eine Reihe individuell unterschiedlich ausgeprägter Vorgänge, in deren Zentrum proliferative Prozesse der Gefäßwand stehen, welche über Zwischenstadien zur Plaquebildung führen, sich äußernd in der genannten Atheromatose. Hierbei akkumulieren Lipide, insbesondere LDL, wodurch sich weiche, lipidreiche, instabile Plaques ausbilden. Diese drohen durch vielfache Auslöser über noch nicht völlig verstandene

Prozesse aufzubrechen (»Plaqueruptur«), so daß es zu einer Thrombusbildung und dem Verschuß des Blutgefäßes kommen kann.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Mosaiksteinchen zusammengetragen, um ein Bild der einzelnen beteiligten Prozesse zu erstellen. Man erhofft sich eine effektive Prophylaxe, eine frühzeitigere und sicherere Erfassung der gefährdeten Personen und erfolgreichere therapeutische Interventionen.

II. Stand der Forschung

1. Die Lipoproteine LDL und HDL

Die wasserunlöslichen Lipide, v.a. Cholesterin, Cholesterinester, Triglyzeride, Phospholipide sowie die Vitamine A, D, E und K, müssen zum Transport mit Apolipoproteinen zu wasserlöslichen Lipoproteinen komplexiert werden. Deren Klassifizierung erfolgt gemäß ihrer hydratisierten Dichte, welche in Abhängigkeit vom Protein-Lipid-Verhältnis zwischen 0,9 g/ml und 1,21 g/ml liegt (zur Einführung z.B. Auenanger und Kattermann, 1995). Mit den einzelnen Fraktionen assoziiert finden sich bestimmte Apolipoproteine (Apo A-E), die in unterschiedlichem Ausmaß als Strukturproteine, Enzym-Kofaktoren oder Liganden für Zellrezeptoren fungieren. In dieser Arbeit wurden die Lipoproteintypen niedriger (LDL) und hoher Dichte (HDL) untersucht, die bekanntermaßen die höchste pathophysiologische Relevanz für die Arterioskleroseprogression aufweisen. Die wesentlichen Eigenschaften dieser beiden Spezies sind in Tabelle 1 (nächste Seite) gegenübergestellt.

Tab. 1: Gegenüberstellung von LDL und HDL (in Anlehnung an Gotto et al., 1986):

	LDL	HDL
Hydratisierte Dichte:	1,019 - 1,063 g/ml	HDL ₂ : 1,063 - 1,125 g/ml HDL ₃ : 1,125 - 1,210 g/ml
Partikelgröße:	15-30 nm	HDL ₂ : 9 - 12 nm HDL ₃ : 5 - 9 nm
Elektrophorese:	β	α_1
Zusammensetzung:	Chol.: 45%, Phospholipide: 25%, Triglyzeride: 10%, Protein: 20-25%	Chol.: 20%, Phospholipide: 30%, Triglyzeride: 2-5%, Protein: 48-50%
Apolipoproteine:	B ₁₀₀	A, ev. C, E, selten D
Assoziierte Enzyme:	PAF-AH	PAF-AH, PON, LCAT und andere
Herkunft:	Metabolisierungsprodukt von VLDL (sekundär von der Leber)	Darm und Leber (als „diskoidal naszierendes HDL ₁ “) mit Ausformung im Plasma („sphärisches HDL _{1/2} “)
Physiolog. Funktion:	Cholesterintransport von der Leber in die Körperperipherie	u.a. Cholesterinrücktransport

LDL und HDL differieren per definitionem in ihrer hydratisierten Dichte. Darüber hinaus unterscheiden sie sich in einer Reihe weiterer physikochemischer und physiologischer Parameter. Interessanterweise weisen beide Spezies vergleichbare Mengen an Phospholipiden auf.

Serum-Lipoproteinprofil als Risikofaktor der Arteriosklerose

Inzwischen wurde in einer bemerkenswerten Anzahl klinischer Studien als auch experimenteller Untersuchungen der Einfluß der Lipoproteinzusammensetzung im Blut auf arteriosklerotische Läsionen untersucht, insbesondere mit Blick auf die klinischen Folgen Angina pectoris, Myokardinfarkt und plötzlichem Herztod, sowie zerebralen Infarkten, arterieller Verschlusskrankheit und Gesamtmortalität. Als Folge der erhobenen Befunde gilt die Hypercholesterinämie als eigenständiger Risikofaktor der Arteriosklerose, steil ansteigend bei Werten über ca. 230 mg/dl (Wood, 1998). Ebenfalls anerkannt ist die gleichsinnige Korrelation der Serumkonzentrationen für LDL-Cholesterin oder Apo B-100 mit der Häufigkeit der genannten Erkrankungen, was sich in den gängigen Richtlinien für eine risikoadaptierte Therapie widerspiegelt: In der Sekundärprophylaxe bei bekannter KHK wird ein LDL-Cholesterin sogar unter 100 mg/dl angestrebt, in der Primärprophylaxe differieren die Empfehlungen der einzelnen Fachgesellschaften – die Werte sollten 160-190 mg/dl nicht übersteigen.

Im Gegensatz dazu erwies sich HDL als negativ korreliert zum Auftreten arteriosklerosebedingter Folgeerkrankungen; man spricht daher auch vom »negativen Risikofaktor« bei einem HDL-Cholesterin > 60 mg/dl (NCEP, 2001) oder zieht Quotienten zur Risikoabschätzung heran

(Gesamtcholesterin/HDL > 5 bedeutet erhöhtes Risiko; Wood, 1998). Die Versuche, aus der in sich heterogenen HDL-Population einen besonders protektiven HDL-Typ zu identifizieren, erbrachten inkonsistente Ergebnisse. Einige Untersuchungen stuften das größere und etwas weniger dichte HDL₂ als besonders protektiv ein (Miller, 1987), andere das kleinere und etwas dichtere HDL₃ (Atger et al., 1995), wieder andere mit bestimmten Apolipoproteinen (z.B. Apo A-I bzw. Apo E) oder Enzymen (z.B. Paraoxonase) assoziierte HDL-Formen (jeweils Ohta et al., 1989; Mahley, 1988; Mackness und Durrington, 1995; Blatter et al., 1993, Watson et al., 1995). Einige Studien ergaben keinerlei derartige Unterschiede (Brook et al., 1982; Wallentin und Sundin, 1985). So wechselhaft wie die Ergebnisse sind auch die Begründungen. Deshalb und da es sich bezüglich Zusammensetzung und Funktion um verschiedenartige Makromoleküle handelt (Gotto et al., 1986; Silverman et al., 1993), wird in dieser Arbeit zunächst zwischen HDL₂ und HDL₃ unterschieden.

Komplexe Wechselwirkungen widerlegen vereinfachte Schemata

Erste Hypothesen begründeten die atherogenen Eigenschaften des LDL mit dessen Akkumulation in der wachsenden Plaque. LDL fungiert physiologischerweise als Cholesterin-Verteiler in die Körperperipherie. Das Vorhandensein von Cholesterin in arteriosklerotischen Läsionen ist seit langem bekannt (Virchow, 1858). Ganz analog sollten die tendenziell antiatherogenen Eigenschaften des HDL in dessen Funktion als Cholesterinfänger und -rücktransporter begründet sein (Miller, 1985; Pieters et al., 1994). Aus heutiger Sicht ist dieses Modell in seiner Ausschließlichkeit nicht mehr haltbar: Genauso wie natives, d.h. frisches und unverändertes LDL nicht grundsätzlich als atherogen bezeichnet werden kann, etwa weil seine Aufnahme in die Zelle den normalen Regulationsmechanismen unterliegt und somit sättigbar ist (Beisiegel, 1992), genauso gibt es Situationen, in denen HDL proinflammatorisch und atherogen wirkt, beispielsweise bei Einwirken von Entzündungsreizen (van Lenten et al., 1995). Eine deutliche Sprache sprechen diesbezüglich immunologische Untersuchungen der in Plaques vorhandenen Proteine und Peptide: Neben dem erwarteten Apo B fanden sich dort auch für HDL typische Apolipoproteine wie Apo A-I, Apo A-II und Apo E (Guyton und Klemp, 1996).

2. Lipid- und Lipoproteinoxidation

Das Modell der Kupfer-katalysierten Oxidation

Die Unzulänglichkeit des vereinfachten Gedankenmodells vom atherogenen LDL und protektiven HDL führte D. Steinberg zu der Forderung weiterzublicken (« ... move beyond cholesterol ...») und damit zu seiner inzwischen anerkannten Hypothese der LDL-Oxidation (Steinberg et al., 1989). Dabei stützte er sich unter anderem auf experimentelle Ergebnisse von M. S. Brown und J. L. Goldstein über die Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen bei der Aufnahme azetylierten LDLs via den »scavenger-pathway«, auf Versuche von T. Henriksen et al., diese Ergebnisse in einen physiologischeren Kontext zu stellen, nämlich die Koinkubation von LDL mit Endothelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen, und schließlich die Erkenntnisse von U. P. Steinbrecher et al. bzw. D. W. Morel et al., daß es sich bei den Veränderungen durch Koinkubation mit Zellen letztlich um oxidative Veränderungen handelt. Diese Oxidationsvorgänge am LDL-Partikel konnten *in vitro* durch Antioxidantien verhindert werden. Als einfacheres und reproduzierbareres Modell setzte sich daraufhin die Inkubation von LDL mit mehrwertigen Kationen als Katalysatoren durch, meist unter Verwendung von Kupfer (Esterbauer et al., 1990). Solche Kationen finden sich auch in den gängigen Zellkulturmedien. Alternativ wird von manchen Gruppen mit bestimmten Radikalen direkt oxidiert, von anderen eine meist längerfristige Autoxidation quasi abgewartet (Berliner et al., 1990). Der Großteil unserer Experimente wurde mit milde oxidiertem LDL (mox-LDL) durchgeführt, wie von Weidtmann et al. (1995) beschrieben. Analog wurden auch HDL₂ und HDL₃ oxidiert.

Lipoproteinoxidation *in vivo*

Inzwischen ist eine beträchtliche Anzahl v.a. experimenteller Daten verfügbar, die das Vorkommen der Lipoproteinoxidation auch *in vivo* untermauern:

1. In atherosklerotischen Plaques finden sich parallel zum Fortschreiten der Läsion vermehrt Lipidoxidationsprodukte, welche in ihrer Heterogenität auf vorwiegend unspezifische, nicht-enzymatische Reaktionen hindeuten könnten. Das extrahierte Material ähnelt in vielerlei Hinsicht *in vitro* oxidiertem LDL, insbesondere sind die untersuchten biologischen Effekte im wesentlichen identisch (Ylä-Herttuala et al., 1989; Smith et al., 1992).
2. Aus dem normalen Plasma-LDL läßt sich eine Subfraktion isolieren (5-20% des Gesamt-LDL), die u.a. in Hinsicht auf Elektronegativität, Gehalt an konjugierten Dienen und ihre rasche Aufnahme durch Makrophagen dem *in vitro* oxidierten LDL ähnelt (Avogaro et al., 1988 und

1991). Diese »LDL« bezeichnete Subfraktion weist einen erhöhten Gehalt an Hydroperoxiden auf (Sevanian et al., 1997). Wenn die Oxidationsvorgänge intensiv genug waren, auch den Proteinanteil verändert zu haben, finden sich im Serum Antikörper gegen oxidiertes LDL. Spannenderweise zirkulieren dort sogar oxidierte Lipide (7 β -Hydroxycholesterol, Hydroperoxide), die in ihrer freien Form, d.h. nicht an z.B. Albumin gebunden, unvermindert bioaktiv bzw. zytotoxisch sind (Salonen et al., 1992 und 1997). Wie vergleichende Untersuchungen mittels Immunoassays ergaben, weisen Patienten mit koronarer Herzerkrankung erhöhte Spiegel zirkulierender, oxidierter LDL-Spezies im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden auf (Holvoet et al., 1998).

3. Des weiteren beschleunigen diätetisch zugeführte, artifiziell oxidierte Lipide das Wachstum atherosklerotischer Läsionen im Tiermodell, wobei die Blutspiegel oxidierter Lipoproteine direkt mit der Menge oxidierter Lipide in der Diät korreliert sind (Staprans et al., 1996).
4. Bei bestimmten chronischen Erkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus, finden sich gehäuft solche Oxidationsprodukte (Meraji et al., 1992; Chisolm et al., 1992). Überhaupt ist die Lipidoxidation ein häufiges pathogenetisches Phänomen im menschlichen Organismus. Neben der Arteriosklerose spielt sie eine Rolle ganz allgemein bei Entzündungsreaktionen, Infektionen, (exogen-) toxischen Zellschädigungen, der Karzinogenese sowie Ischämie und Reperfusion von Organen (Dargel, 1992); im neurologischen Bereich beschäftigt man sich zunehmend damit, da man für eine Reihe der an Bedeutung gewinnenden dementiellen Erkrankungen eine Beteiligung oxidativer Vorgänge postuliert.

Oxidationsmodell und biologische Wirkungen

Bei der Oxidation von Lipoproteinen laufen komplexe, sich z.T. zeitlich überlappende Vorgänge ab. Je nach gewähltem experimentellen Modell ergeben sich mehr oder minder stark oxidierte Lipoprotein-Spezies mit teilweise differierenden physikochemischen oder biologischen Eigenschaften (Esterbauer et al., 1990 und 1992; Berliner et al., 1995). Erste Unterschiede ergeben sich schon bei der Wahl des metallischen Kations: Cu²⁺ wirkt stärker oxidierend als Fe³⁺, v.a. weil es in einer LDL-Suspension leichter und rascher in die aktiv-oxidierende Form Cu⁺ überführt wird (Lynch und Frei, 1993 und 1995). Bei konstanten äußeren Bedingungen, wie fixer Temperatur (37°C), Dunkelheit, Stase bzw. kontinuierlicher Durchmischung etc., bestimmt das molare Verhältnis von Katalysator und Lipoprotein über die Zeit das Ausmaß der durchschnittlichen Oxidation (Gieseg und Esterbauer, 1994). Da es sich bei LDL als auch bei HDL aber um komplex zusammengesetzte Makromoleküle handelt (siehe Abbildung 1), verändert sich

nicht das gesamte Partikel homogen, sondern die polareren Oberflächenlipide oxidieren – aufgrund ihrer besseren Zugänglichkeit durch den Katalysator – vor den Kernlipiden (Tribble et al., 1996) und vor dem Proteinanteil (Meyer et al., 1996).

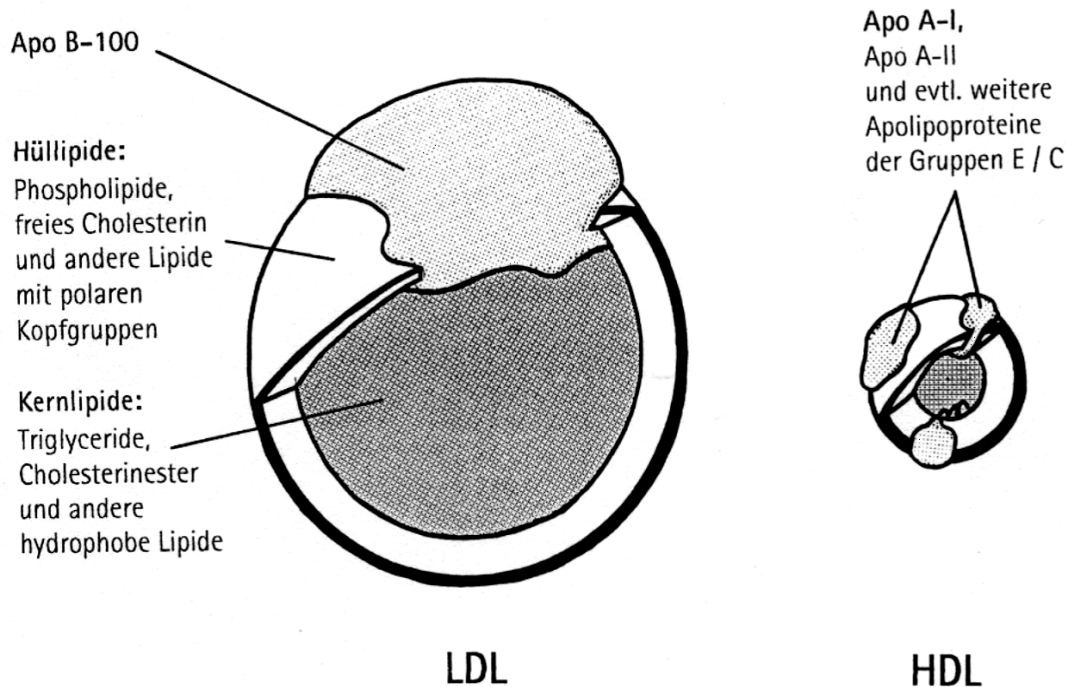


Abb. 1: Struktur nativer Lipoproteine

Im prinzipiellen Aufbau ähneln sich LDL und HDL: Ein Kern aus hydrophoben Lipiden wird von polaren Lipiden ummantelt, in die die einzelnen Lipoproteine eingebettet sind. Bei den gängigen Methoden dürfte die Oxidation der äußeren Bestandteile rascher beginnen und voranschreiten.

Zu diesen methodisch bedingten Unterschieden kommen nachhaltige individuelle Unterschiede in der Empfänglichkeit von Lipoproteinen gegenüber oxidativen Einflüssen: Beispielsweise variiert der endogene Gehalt von LDL an Antioxidantien wie Tocopherolen und Carotenen je nach Blutspender (Raucher vs. Nichtraucher, Ernährung, ...), was zumindest anfänglich Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der Oxidation hat (Ziouzenkova et al., 1996).

Simplifiziert läßt sich feststellen, daß *stark* oxidierte Formen von Lipoproteinen eher zytotoxisch wirken und rascher von z.B. Makrophagen phagozytiert werden (Coffey et al., 1995 bzw. Staprāns et al., 1996), während die *milder* oxidierten Formen häufiger spezifische biologische Reaktionen an Effektorzellen hervorrufen (Weidtmann et al., 1995; Berliner et al., 1995). Im

pathophysiologischen Kontext von Plaquewachstum mit langjähriger Zellproliferation und Thrombose mit der Aktivierung reagibler Thrombozyten scheinen diese bioaktiven Formen interessanter.

Durch milde oxidierte Lipoproteine hervorgerufene Effekte wurden inzwischen an einer Vielzahl von am Atheroskleroseprozeß beteiligten Zellsystemen untersucht, insbesondere an Endothelzellen (Rajavashisth et al., 1990), Monozyten/Makrophagen (Berliner et al., 1990), glatten Gefäßmuskelzellen (Augé et al., 1996; Cushing et al., 1990) und Thrombozyten (Meraji et al., 1992; Weidtmann et al., 1995).

Erste Hypothesen zu wirksamen Konstituenten

Trotz dieser zahlreichen Untersuchungen hat man bisher nur wenige Hinweise auf etwaige biologisch wirksame Komponenten der milde oxidierten Lipoproteine. Nur die Gruppe um J. Berliner und A. M. Fogelman hat bislang aktive Substanzen des von ihnen untersuchten minimal modifizierten LDL (mm-LDL) genauer charakterisiert: Es handelt sich um Phospholipide mit PAF-ähnlicher Wirkung auf Endothelzellen bzgl. ihrer Fähigkeit, Monozyten zu binden (Berliner et al., 1990). Mit Hilfe der Massenspektrometrie wurden hierbei zwei Moleküle identifiziert: 1-Palmitoyl-2-(5-Oxovaleryl)-sn-Glycero-3-Phosphocholin und 1-Palmitoyl-2-Glutaryl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, welche aus dem sich wie mm-LDL verhaltenden Autooxidationsprodukt von 1-Palmitoyl-2-Arachidonoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin isoliert werden konnten. Die Präsenz dieser beiden Lipide in arteriosklerotischen Läsionen konnte man auch tierexperimentell an Kaninchen bzw. Maus nachweisen (Watson et al., 1995 und 1997).

In der Bewertung dieser Experimente, sollte nicht übersehen werden, daß die konkret identifizierten Oxidationsprodukte nicht aus einer Lipoproteinsuspension, sondern aus einem isolierten Lipid, eben dem benannten Phosphatidylcholin, gewonnen wurden.

3. Thrombozyten und Arteriosklerose

Die Thrombozyten (θρομβος: Blutpfropf) erfüllen eine unverzichtbare Funktion bei der Hämostase, indem sie bei einer Gefäßverletzung in kürzester Zeit für einen primären Wundverschluß sorgen. Wie beim Gerinnungs-Fibrinolyse-System besteht physiologisch auch im thrombozytären System ein ausbalanciertes Optimum zwischen petechialen Blutungen und Suffusionen einerseits und thrombotischem Gefäßverschluß andererseits, bestimmt durch Menge und Reagibilität

der Thrombozyten. Folgerichtig ist die medikamentös bewirkte Verschiebung dieser Balance zur Thrombose- und Embolieprävention mit Hilfe von Thrombozytenhemmstoffen, etwa Aspirin, bei Krankheitsbildern, die den arteriellen Schenkel betreffen, seit langem Routine und wurde in den letzten Jahren durch die Einführung potenter ADP-Rezeptorblocker und Glykoprotein IIb-IIIa-Antagonisten erweitert (Braunwald et al., 1998; Adgey, 1998; Huber, 2000).

Atherogene Rolle der Thrombozyten

Bereits im 19. Jahrhundert war bekannt, daß ein persistierender Thrombus organisiert und in die Gefäßwand inkorporiert wird und somit zur Progression arteriosklerotischer Läsionen beiträgt (Virchow, 1858). Von solchen und ähnlichen *in vivo* stattfindenden Interaktionen zeugen beispielsweise Reste phagozytierter Thrombozyten, die sich in Schaumzellen wiederfinden, sowie deren Vorgängern als Lipidquelle dienen (Sevitt, 1986). Die Idee einer atherogenen Rolle von Thrombozyten weiterführend konnten S. Moore et al. (1976) mittels einer experimentell induzierten Thrombozytopenie verhindern, daß sich – wie sonst üblich – durch wiederholt in Gefäßwänden von Kaninchen gesetzte Mikroläsionen typische lipidreiche Plaques bildeten. In etwas anderer Form macht man sich diesen Umstand heute bei Koronarangioplastien (PTCA) und v.a. damit verbundenen Stentimplantationen zunutze, wo man durch die kurz- und mittelfristige Applikation starker, kombinierter Thrombozytenhemmer die Restenoserate deutlich zu senken vermag (Schömig et al., 1996). Wie heute vermutet wird, ist dies darauf zurückzuführen, daß sich an der Läsion kein (neuerlicher) Thrombus zu formieren vermag und die lokale Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Blutplättchen unterbunden wird.

R. Ross hat sich mit Wechselwirkungen zwischen endothelgeschädigter Intima und Thrombozyten beschäftigt und v.a. den Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF, chemotaktische und mitogene Aktivität) für die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in der Plaque verantwortlich gemacht (Ross, 1989). Man geht davon aus, daß bereits aufgrund einer geringen Endothelläsion Thrombozyten an der arteriellen Gefäßwand adhären und dabei – sei es durch die unmaskierte subendotheliale Matrix, sei es mittels freigesetzter Mediatoren – aktiviert werden, d.h. die Gestalt ändern, aggregieren und die Inhaltsstoffe ihrer Speichergranula sezernieren (van Zanten et al., 1994). Die α -Granula entleeren sich bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen von Plättchenagonisten und setzen besagte biologisch hochaktive Substanzen frei: Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- α bzw. TGF- β , IGF-1, FGF, PD-ECGF) und adhäsions- und gerinnungsfördernde Faktoren (z. B. Willebrand-Faktor, Fibronectin, Faktoren I, V, VIII). Über spezifische Adhäsionsmoleküle wie das P-Selektin (CD 62, PADGEM, GMP-140), ein integrales

Membranprotein der α -Granula, finden hierbei auch gerichtete Interaktionen z. B. mit Monozyten statt. Sodann setzen auch die elektronendichten Granula ihre aggregationsfördernden und vasokonstriktiven Mediatoren frei (v.a. Serotonin, ADP, Ca^{2+}). Das autokrin ebenfalls plättchenaktivierende und vasokonstriktiv wirksame Thromboxan A_2 (TXA_2) wird über die rasche Aktivierung eines speziellen Stoffwechselwegs gebildet und freigesetzt. Dasselbe gilt für die Lysophosphatidsäure (LPA), auf die in einem gesonderten Kapitel näher eingegangen wird. Eine Übersicht über Aktivierungsmechanismen und hämostaseologische Funktion der Thrombozyten gibt Siess, 1989. In Tabelle 2 sind die im Arterioskleroseprozeß potentiell bedeutsamen Faktoren noch mal zusammengefaßt.

Tab. 2: Bei der Aktivierung von Thrombozyten freigesetzte Agonisten (Auswahl):

Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren		
PDGF	Platelet-derived growth factor	Potentes Mitogen, Chemotaxis von Granulozyten, Vasokonstriktion
PD-ECGF	Platelet-derived endothelial cell growth factor	Wachstum und Chemotaxis von Endothelzellen <i>in vitro</i> , angiogene Aktivität <i>in vivo</i>
FGF	Fibroblast growth factor	Stimuliert Wachstum und Motilität von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelien
TGF- β	β -transforming growth factor	Chemotaxis von Makrophagen, stimuliert Fibronektineinbau in die extrazelluläre Matrix
PAF	Platelet-activating factor	Stimulation von Chemotaxis und Phagozytose bei Granulozyten und Makrophagen
LPA	Lysophosphatidic acid	Aggregationsfördernd, umfängliche Wirkungen als Wachstumsfaktor, Entzündungsmediator etc.
Adhäsions- und gerinnungsfördernde Faktoren		
vWF	Willebrand Faktor	Ermöglicht Plättchenadhäsion an Kollagen, Gerinnungs-Kofaktor
FN	Fibronektin	Ermöglicht Plättchenadhäsion an Gewebezellen, Aktivierungsreaktionen
FI, FV, FVIII	Faktoren I, V, VIII	Essentielle Gerinnungsfaktoren
ADP		Autokriner Plättchenaktivator, wichtiger Verstärker bei Aggregation und Sekretion
Vaskonstriktorische Faktoren		
TXA_2	Thromboxan A_2	Autokriner Plättchenaktivator, stark vasokonstriktiv
5-HT	Serotonin	Aktivator mehrerer Zellsysteme, schwach vasokonstriktiv

Aktivierte Thrombozyten liberieren eine ganze Reihe von Faktoren, denen eine potentielle Rolle bei der Atherogenese zukommt.

Auch klinische Studien neuerer Zeit interpretieren eindeutig eine intrinsisch gesteigerte thrombozytäre Reagibilität als eigenständigen Risikofaktor des Plaquewachstums. Beispielsweise zeigte eine prospektive Studie einen eindeutigen Anstieg der KHK-assoziierten Mortalität nach 13,5 Jahren bei Personen mit relativ höheren Thrombozytenkonzentrationen bzw. einer raschen, leicht induzierbaren Aggregation (Thaulow et al., 1991). Des weiteren fand sich bei Polymorphismusstudien das Allel PI^{A2} des für das Glykoprotein IIIa kodierenden Gens signifikant gehäuft bei (v.a. jungen) KHK-Patienten (Weiss et al., 1996).

Interaktionen von Thrombozyten und Lipoproteinen

Bestimmte Formen der Hyperlipidämie sind gemäß mehrerer Studien mit einer erhöhten thrombozytären Reagibilität vergesellschaftet (Carvalho et al., 1974). Verschiedene Untersuchungen ergaben eine gleichsinnige Korrelation zwischen der Aggregationsneigung von Plättchen und dem Cholesteringehalt ihrer Membranen. M. Aviram und J. G. Brook konnten an gelgefilterten Thrombozyten zeigen, daß deren längerfristige Koinkubation mit LDL (≤ 3 Stunden) zu einer Sensibilisierung gegenüber Thrombin führt, während es nach einer HDL-Inkubation sogar zu geringer ausgeprägten bzw. langsameren Aggregationen kam; dabei konnte keine Eigenaktivität dieser beiden Lipoproteine festgestellt werden. Allerdings scheinen diese Effekte bei Probanden ohne deutlich gestörten Lipidstoffwechsel eher mäßig ausgeprägt zu sein; darüber hinaus erschweren methodologische Unterschiede der Sensibilitätsmessung und der Lipoproteinpräparation (meist keine Untersuchung des Oxidationsgrades) eine korrekte Deutung der Ergebnisse im Detail (Aviram und Brook, 1983).

Oxidationen der Lipoproteine ergaben hingegen regelmäßig Partikel mit deutlich Plättchen-aktivierenden Eigenschaften. So konnten N. G. Ardlie et al. (1989) mit relativ stark oxidiertem LDL im Dosisbereich über 200 mg/l und vorgelegtem Fibrinogen eine Aggregation gewaschener Thrombozyten auslösen. Auf gleiche Weise oxidiertes HDL verlor seine protektiven Eigenschaften und wirkte aggregationsfördernd. Diese Effekte ergaben sich unverändert auch nach Hemmung der Zyklooxygenase. In systematischen Experimenten beschrieben S. Meraji und K. R. Bruckdorfer eine Abhängigkeit der Plättchen-aktivierenden Potenz oxidierten LDLs vom Oxidationsgrad mit maximaler Aggregation durch relativ milde oxidierte Formen. Lipidperoxidgehalte über 200 $\mu\text{mol/g}$ LDL-Protein (photometrische Bestimmungsmethode) schienen dagegen die Aggregation zu verhindern - unabhängig von der Oxidationsmethode (Cu^{2+} - oder Endothelzell-Inkubation). Die Autoren berichten außerdem von einer großen

spenderabhängigen Variabilität des Oxidationsgrades. Eine Glykosylierung des LDLs, wie sie bei Diabetikern verstärkt zu finden ist, zeigte hingegen keine Effekte (Meraji et al., 1992). A. Weidtmann et al. (1995) konnten bestätigen, daß nur milde oxidierte LDL-Spezies, unabhängig von der Oxidationsmethode (Cu^{2+} - oder SIN-1-Inkubation), regelmäßig eine Aggregation zu induzieren vermochten; die Analyse der maximal-aktiven LDL-Präparationen ergab einen geringen Anstieg von konjugierten Dienenen (o.D._{nat} : $0,28 \pm 0,04$; o.D._{mox} : $0,55 \pm 0,09$) und Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS; c_{nat} : $0 \mu\text{mol/g}$; c_{mox} : $10,6 \pm 1,5 \mu\text{mol/g}$) sowie eine Abnahme der mehrfach ungesättigten Fettsäuren um 12-30%; die elektrophoretische Mobilität des Apo B-100 fand sich unverändert, eine exogene α -Tocopherol-Substitution beeinflusste die Thrombozyten-aktivierende Wirkung des mox-LDL nicht. Im Gegensatz zu den sensibilisierenden Eigenschaften des stärker oxidierten LDLs N. G. Ardies konnte die mox-LDL-induzierte Aggregation mittels einer Zykllooxygenase- oder Phospholipase A_2 -Hemmung vollständig unterbunden werden. Y. Takahashi et al. (1996) dehnten mit etwas stärkeren Oxidationsverfahren die Untersuchungen auf HDL aus (TBARS: c_{LDL} : $105 \mu\text{mol/g}$; c_{HDL} : $35 \mu\text{mol/g}$). In Dosisbereichen über 6,5 mg/l ox_T -LDL bzw. über 40 mg/l ox_T -HDL konnten sie eine Aggregation und einen Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels in gewaschenen Thrombozyten auslösen (unabhängig von der Hemmung der Zykllooxygenase); im Gegensatz zu den milde oxidierten Formen anderer Gruppen gelang dies allerdings nicht in PRP. Diese Effekte der oxidierten Lipoprotein-Spezies ließen sich durch natives HDL als auch natives LDL dosisabhängig hemmen.

Im Gegensatz zu den frühesten der angeführten Experimente mit oft langfristigen Koinkubationen ungenau definierter LDL-Spezies konzentrierten sich die Forschungen in den letzten Jahren also zunehmend auf *rasche* Aktivierungsreaktionen und deren Hemmung, wie sie auch von uns untersucht wurden.

In vivo ergeben sich mehrere Möglichkeiten des intraluminalen Kontakts zwischen oxidiertem LDL und Thrombozyten: Zum einen entleert sich bei Ruptur einer lipidreichen, arteriellen Plaque ein Anteil des ox-LDL ähnelnden Kernmaterials ins Gefäßlumen, führt zur Plättchenaggregation (Falk et al., 1995) und gegebenenfalls konsekutiv zur arteriellen Thrombose oder Thromboembolie, ein akutes Krankheitsgeschehen. Zum zweiten werden Blutplättchen beim Kontakt mit atheromatösen Läsionen, insbesondere exulzerierten Plaques, aktiviert; sie können entweder an der Gefäßwand zu appositionellem Wachstum der Plaque führen oder in Form von Mikroaggregaten im Gefäß weitertransportiert bzw. abgespült werden. Zum dritten zirkulieren

parallel zu den Thrombozyten die beschriebenen oxidierten LDL-Formen im Blut, beispielsweise »LDL-« (Hodis et al., 1994; Sevanian et al., 1997). Hier finden mittel- und langfristig in gewissem Umfang sich wiederholende Kontakte statt.

4. Lysophosphatidsäure und ihre biologische Wirkung

Die Lysophosphatidsäure (LPA) stellt das einfachste Glyzerophospholipid dar (1-Acyl-Glyzerol-3-Phosphat). Seit langem bekannt als Vorstufe in der Phospholipid-Biosynthese beginnt man erst in neuerer Zeit auch ihre Bedeutung als Signalmolekül zu verstehen (Moolenaar, 1995).

Bildung und Vorkommen

Bislang kennt man zwei gesicherte Bildungswege, die zu einer Freisetzung führen und damit die Wirkung als Mediator ermöglichen: Zum einen wird LPA von aktivierten Thrombozyten gebildet und liberiert bzw. wird von aktivierten Thrombozyten freigesetztes Lysophosphatidylcholin (LPC) durch eine plasmaständige Lysophospholipase D (Lyso-PLD, Autotaxin) zu LPA katalysiert (Aoki et al., 2002; Moolenaar, 2002). Folglich sind die Konzentrationen von LPA im Serum höher als im Plasma (Baker et al., 2000). Etwa die Hälfte der im Serum vorhandenen LPA-Menge entsteht plättchenabhängig (Aoki et al., 2002). Im Serum ist LPA an Albumin gebunden und trägt in dieser »Transportform« maßgeblich zur Aktivität sog. gealterten Serums bei (Mauco et al., 1978; Schumacher et al., 1979; Billah et al., 1981; Watson et al., 1985; Eichholtz et al., 1993; Tigyi und Miledi, 1992).

Zum anderen hydrolysiert eine nicht-pankreatische, sekretorische Phospholipase A₂ (sPLA₂ oder Typ II PLA₂) Phospholipide von Mikrovesikeln, wobei aus oberflächlich angehäufter Phosphatidsäure (PA) LPA entsteht. Solche Mikrovesikel werden u.a. von Blutzellen unter dem Einfluß inflammatorischer Stimuli (»Streßreize«) abgeschnürt (Fourcade et al., 1995).

Insgesamt findet sich Lysophosphatidsäure im Plasma in physiologisch wirksamen Konzentrationen von 0,5–1 µM (Gaits et al., 1997; Baker et al., 2001). Daß sich mit anderen methodischen Ansätzen höhere Mengen ergeben, wird durch postulierte, physiologisch in Plasma bzw. Serum vorkommende LPA-ähnliche Moleküle erklärt (Baker et al., 2000). Bei malignen Erkrankungen, etwa dem Ovarialkarzinom, sind die Serumspiegel gegenüber Gesunden mindestens zehnfach erhöht (Übersicht in Moolenaar, 1999). Zum Verständnis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darf nicht vergessen werden, daß in Blut, Plasma und Serum der

Großteil der Lysophosphatidsäure an andere Moleküle, insbesondere Albumin, gebunden ist und der freie Anteil nur im niedrigen bis mittleren nanomolaren Bereich liegt (hierzu auch Siess, 2002). Zumindest für einen der drei bekannten LPA-Rezeptoren (EDG7 = LPA₃) ist darüber hinaus ein direkter hemmender Einfluß von Albumin auf die LPA-Wirkung beschrieben (Hama et al., 2002).

Biologische Wirkungen

Als frühe agonistische Eigenschaft der Lysophosphatidsäure fand man die aggregationsfördernde Wirkung auf Thrombozyten (Gerrard et al., 1979; Schumacher et al., 1979), von der auch rasch klar wurde, daß es sich um spezifische Vorgänge durch extrazellulären Angriff handeln müsse (Watson et al., 1985). Dies ist insofern nicht selbstverständlich, als LPA die Zellmembran zu durchdringen vermag. Allerdings wirkt es im Gegensatz zu anderen Lysophospholipiden – etwa Lysophosphatidylcholin (LPC) – nicht lytisch, vermutlich aufgrund der vergleichsweise sehr kleinen Kopfgruppe. Überhaupt wurden für LPA im Gegensatz zu anderen Lipidmediatoren – beispielsweise PAF – bislang keine unspezifischen und Rezeptor-unabhängigen Effekte beschrieben. Jedoch kennt man inzwischen eine hohe Anzahl von Effektorzellen, die nach LPA-Stimulation über spezifische, G-Protein gekoppelte Rezeptoren unterschiedlichste Reaktionen zeigen. Einige Autoren sprechen von LPA als dem wohl wichtigsten Wachstumsfaktor überhaupt (van Corven et al., 1989; Moolenaar, 1995). Dazu passend mußte festgestellt werden, daß kaum eine Zellkultur unter Abwesenheit von LPA im Medium gedeiht. Tabelle 3 (nächste Seite) gibt eine Übersicht der wichtigsten biologischen Effektorsysteme und ihrer Reaktionen.

Tab. 3: Biologische Effekte von Lysophosphatidsäure (Auswahl):

Effektorzelle	Reaktion
Thrombozyten:	Formwandel, Aggregation (Erläuterungen im Text)
Fibroblasten:	Proliferation, Phosphorylierung fokaler Adhäsionskinasen, Fibronektinbindung, Depolarisierung durch Cl^- -Ausstrom, Streßfaserbildung, isometrische Kontraktion
Glatte Gefäß-muskelzellen:	Proliferation, Kontraktion, Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels
Endothelzellen:	Proliferation, Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, Streßfaserbildung, Kontraktion und Erhöhung der Permeabilität
Keratinocyten:	Proliferation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> , Differenzierung (Konfluieren)
Makrophagen und T-Lymphocyten:	Schutz vor Apoptose
Karzinomzellen:	Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, Tumorzellinvasion <i>in vitro</i>
Neuronale Zelllinien:	Kollaps des Axonhügels und Retraktion des Axons, Freisetzung von Neurotransmittern
Artfremde Zellen:	Depolarisierung durch Cl^- -Ausstrom (<i>Xenopus</i> Oocyten), Chemotaxis (<i>Dictyostelium</i> Amöben)

Als Signalmolekül und zentraler Wachstumsfaktor wirkt LPA auf eine Vielzahl von Effektormolekülen – meist proliferativ oder als Streßreiz (Übersicht: Siess, 2002 bzw. Siess et al., 2000. Zudem: Tigyi et al., 1992; Seufferlein und Rozengurt, 1994; Postma et al., 1996; Fuentes et al., 1997; Jalink et al., 1997).

Hypothetische Funktionen *in vivo*

Das Verteilungsmuster der bekannten LPA-Wirkungen führte bis zur Zeit der vorliegenden Arbeit zunächst zu zwei Hypothesen der physiologischen LPA-Funktionen *in vivo*:

1. Ihre Freisetzung durch aggregierende Thrombozyten und ev. auch durch verletzte Zellen (»Streßreize«) zusammen mit den Reaktionen von Endothel- und Bindegewebszellen wurden als Zeichen für eine wichtige Rolle bei der Wundheilung angesehen (Moolenaar, 1995).
2. Die Häufung von LPA-Rezeptoren im Gehirn und die Erregbarkeit neuronaler Gewebe ließ manche Autoren auf eine neuromodulatorische Funktion schließen (van der Bend et al., 1992; Thomson et al., 1994; Hecht et al., 1996).

Eine denkbare *pathophysiologische* Rolle wurde aber bis dahin in der Literatur nicht beschrieben: Praktisch sämtliche am Arterioskleroseprozeß beteiligten Zellen sind auf die eine oder andere Weise durch LPA erregbar (siehe Tabelle 3) und die Freisetzung dieses potenten Mediators erfolgt durch aktivierte Thrombozyten direkt vor Ort, wodurch ein lokal stark

atherogenes Mikroenvironment geschaffen wird (bei wohl vernachlässigbarer systemischer Wirkung, da LPA von bestimmten intakten Zellen verhältnismäßig rasch abgebaut wird).

Seither erweiterte sich das Wissen durch rege Forschungstätigkeit dramatisch; das Bild LPA-induzierter Effekte ist hoch komplex und es werden laufend neue Ergebnisse publiziert (Review: Moolenaar, 1999). Beispielsweise wird LPA im Rahmen seiner migrationssteigernden Wirkung eine wesentliche, pathophysiologische Rolle bei der Progression bestimmter Tumore zugeschrieben, insbesondere hin zu einem invasiveren und metastasierenden Phänotyp (Moolenaar, 2002), was in Einklang steht zu den erwähnten erhöhten LPA-Spiegeln im Rahmen onkologischer Erkrankungen.

Ganz wesentlich auch im Kontext der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse zu *LPA-Rezeptoren*, die aus dem Willen zur Vereinheitlichung teilweise mehrfach umbenannt wurden. So ließ sich etwa der erwähnte, vom Gen *Vzq-1* kodierte Rezeptor (Hecht et al., 1996) der zweiten homologen Gruppe von drei LPA-Rezeptoren aus einer größeren Familie von Lysophospholipid-Rezeptoren zuordnen, nämlich der strukturell verwandten Familie der Edg-Rezeptoren, benannt nach einem Gen, welches während der frühen Endothelzell-Differenzierung exprimiert wird (Hla und Maciag, 1990). Die erste homologe Gruppe hingegen zeigt ihre höchste Affinität gegenüber Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P), auf welches später noch eingegangen wird. Inzwischen hat sich die logischere Nomenklatur in LPA- und S1P-Rezeptoren, entsprechend des bevorzugten Substrats durchgesetzt (Vorschlag: Chun et al., 1999; Übersicht: Hla et al., 2001). Der von der Gruppe um G. Tigi klonierte LPA-Rezeptor PSP24 (Liliom et al., 1996; Guo et al., 1996) kann keiner der beiden Gruppen zugerechnet werden; von diesem Rezeptor wird übrigens berichtet, er könne durch Lidocain bzw. Bupivacain inhibiert werden, wodurch die klinisch regelmäßig zu beobachtende verzögerte Wundheilung nach Verwendung dieser Lokalanästhetika erklärt würde (Nietgen et al., 1997). In der aktuelleren Literatur findet dieser Rezeptor allerdings kaum mehr Erwähnung.

Angesichts der zahlreichen beschriebenen LPA-Effekte gerade auch während der Embryonalentwicklung überraschen die ersten Ergebnisse aus Studien mit LPA-Rezeptor-defizienten Mäusen (Yang et al., 2002): Immerhin etwa die Hälfte der $LPA_1^{-/-}$ -Mäuse war überlebensfähig, die neonatale Sterblichkeit sowie ein bis zu 30% reduziertes Körpergewicht wurde auf ein gestörtes Trinkverhalten zurückgeführt. Neben kraniofazialen Dysmorphien und selten frontalen Hämatomen bei der Geburt fanden sich Veränderungen auf zellularem Niveau, etwa eine deutlich höhere Adenylatzyklaseaktivität in Fibroblasten nach LPA-Stimulation bei

gleichzeitigen Hinweisen auf kompensatorische Mechanismen. LPA₂^(-/-)-Mäuse entwickelten sich sogar phänotypisch normal. Auf zellulärer Ebene zeigte sich beispielsweise eine reduzierte PLC-Aktivierung nach LPA-Stimulation an Fibroblasten. Folglich scheint ein einzelner LPA-Rezeptordefekt zumindest teilweise kompensierbar zu sein. Tabelle 4 stellt die drei vorwiegend untersuchten LPA-Rezeptoren gegenüber; auf die angeführten G-Proteine wird später eingegangen.

Tab. 4: LPA-Rezeptoren, nachgeschaltete G-Proteine (Siess, 2002),
Phänotyp Rezeptor-defizienter Mäuse (Yang et al., 2002):

Neue Nomenklatur:	LPA ₁	LPA ₂	LPA ₃
Edg-Nomenklatur:	Edg-2	Edg-4	Edg-7
Sonstige Bezeichnungen:	Vzg-1		
G-Proteine:	G _i , G _{12/13} , G _q ?	G _i , G _q , G _{12/13}	G _i , G _q
Phänotyp bei »Knock-out«-Mäusen:	50% neonatale Letalität, Verhaltensänderungen beim gestillt werden, leichter; selten: frontale Hämatome neonatal	Keine auffallenden Veränderungen	-

Verhältnis von Struktur zu biologischer Wirksamkeit

Streng betrachtet stellt »die Lysophosphatidsäure« eigentlich eine ganze Gruppe von Glycerophospholipiden dar, denn je nach Azylrest ergibt sich ein geringfügig anderes Molekül. Dies ist in diesem Kontext deshalb von Bedeutung, weil bei identischem Wirkmechanismus gewisse quantitative Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Subspezies auftreten: Sind langkettige Fettsäureseitenketten (C₁₆ bis C₂₀) am Phosphoglycerin-Rückgrat verestert, beobachtet man maximale Aktivierung der Effektorstrukturen (Moolenaar, 1995).

Die häufigste durch Thrombozyten freigesetzte Subspezies stellt Palmitoyl-LPA dar (siehe Abbildung 2, nächste Seite), gefolgt von Stearoyl- und Arachidonoyl-LPA (Gerrard und Robinson, 1989). Als häufigster Vertreter im Serum findet sich wiederum Palmitoyl-LPA, gefolgt von Oleoyl-LPA (ebenfalls Abbildung 2). Bereits vor zwei Dekaden wurden systematische Untersuchungen über die aggregationsinduzierende Aktivität von LPA und LPA-ähnlichen Lipiden durchgeführt, mit teilweise deutlich voneinander abweichenden Werten der EC₅₀ (Tokumura et al., 1981).

Der Begriff der LPA-ähnlichen Lipide wurde in anderem Kontext von G. Tigyi et al. (1992) aufgegriffen, der neben der eigentlichen Lysophosphatidsäure verschiedenste, chemisch mehr

oder minder verwandte Lipide an Serumalbumin gebunden fand. Dies führte zu der Hypothese, LPA könnte zu einer neuen Familie von Phospholipidmediatoren mit zum Teil überlappenden biologischen Aktivitätsmustern gehören. Als solche wurden beispielsweise Sphingosinderivate wie Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P), von manchen Autoren sogar PAF-ähnliche, veretherte Verbindungen mit einem kurzen Azyrest an der sn-2-Position benannt. Weitere Studien zeigten allerdings, daß spezifische Reaktionen dieser Agonisten wohl eher über distinkte Rezeptoren vermittelt werden. Ausführliche Untersuchungen wurden hierzu von K. Jalink et al. (1995) an menschlichen A431-Karzinomzellen durchgeführt. Thrombozytenbezogen wird auf diese Diskussion später noch eingegangen werden.

LPA-Rezeptorantagonisten: NPTyrPA und NPSerPA

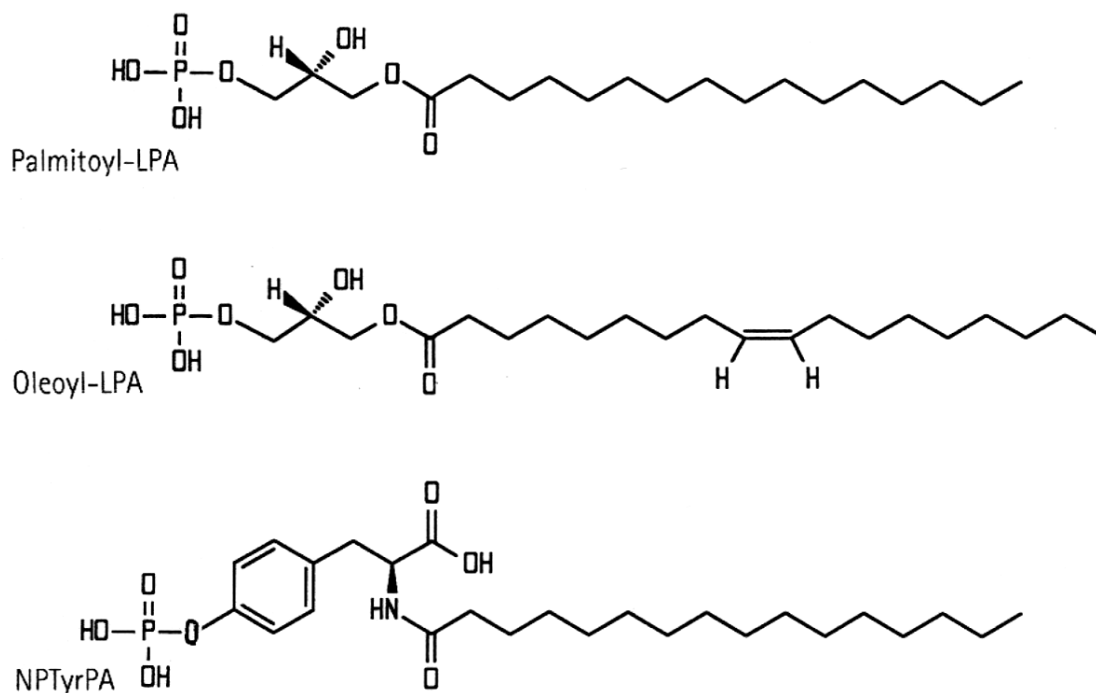


Abb. 2: Strukturformeln der Lysophosphatidsäure und ihres Antagonisten NPTyrPA

Dargestellt sind Palmitoyl-LPA als die häufigste LPA-Variante im Plasma, Oleoyl-LPA (bei Verwendung des radioaktiven Tracers [3 H]-LPA waren die bezeichneten, der Fettsäuredoppelbindung benachbarten Wasserstoffatome 9 und 10 tritiiert), sowie der LPA-Antagonist NPTyrPA. Alle drei Moleküle wurden in den vorliegenden Versuchen eingesetzt. Deutlich sind in der Gegenüberstellung strukturelle Homologien zu erkennen; über die biologische Potenz des Moleküls entscheidet u.a. die substituierte Fettsäureseitenkette.

Die Gruppe um A. Tokomura synthetisierte im Zuge der erwähnten systematischen Untersuchungen quasi Extremvarianten der LPA-Struktur, die selektiv die LPA-induzierte Thrombozytenaggregation verhinderten. Dabei handelte es sich um N-Palmitoyl-L-Tyrosin-Phosphorsäure (NPTyrPA, siehe Abbildung 2) und um N-Palmitoyl-L-Serin-Phosphorsäure (NP SerPA). Im folgenden wurde von R. Bittman die Synthese simplifiziert und von G. Tigyi der Hemmechanismus näher charakterisiert: Die beiden Stoffe stellen kompetitive Antagonisten am LPA-Rezeptor dar; sie kamen auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung (Sugiura et al., 1994; Bittmann et al., 1996; Liliom et al., 1996).

5. Thrombozytäre Signaltransduktion und Desensibilisierung von G-Proteinen

Regulation der Thrombozytenfunktion über distinkte Signalwege

Die durch eine Aktivierung im Thrombozyten ausgelösten physiologischen Reaktionen können *in vitro* einzeln als Adhäsion, Gestaltwandel, Aggregation und Sekretion studiert werden, während sie *in vivo* im Rahmen der Hämostase eng miteinander verknüpft sind. Der Gestaltwandel vollzieht sich in zwei Phasen: Zunächst nehmen die diskoiden (ruhenden) Plättchen eine sphärische Gestalt an; nach einer Latenzzeit von 1–3 sek. vergrößert sich auf Kosten des offenen kanalikulären Systems (SCS) die (Kontakt-)Oberfläche, v.a. durch die Ausbildung von zunächst kurzen, dann längeren Pseudopodien (Vollbild des sog. Echinosphärozyten; Hantgan et al., 1984). Je nach Art und Konzentration des Agonisten setzt sich diese Aktivierungsreaktion über mehrere Rückkopplungsprozesse, v.a. via Zyklooxygenase (COX) und die Bildung von Thromboxan A_2 (TXA₂), in die Vorgänge von Aggregation und Sekretion fort (Siess, 1989).

In der vorliegenden Arbeit interessierten nur physiologische und spezifische, über exogene Agonisten induzierte Aktivierungsvorgänge, wie sie durch die Exzitation thrombozytärer Oberflächenrezeptoren und nachgeschaltete Übermittlung des Signals durch GTP-bindende Proteine (G-Proteine) hervorgerufen werden. Über verschiedene Second-Messenger-Systeme und deren mannigfache Wechselwirkungen, die derzeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen sind, bewirkt solch eine Rezeptoraktivierung letztlich eine oder mehrere der genannten funktionellen Plättchenantworten. Die gemeinsame, zu einem Gestaltwandel führende Endstrecke, stellt die Phosphorylierung der leichten Myosinketten dar, was zur Initiation des kontraktile Apparates führt (Daniel et al., 1984). Zentrale, bislang als gesichert

geltende Punkte der Signalkaskaden für die beiden in der vorliegenden Arbeit bedeutsamsten Agonisten mox-LDL und LPA sind im folgenden kurz zusammengefaßt.

Mox-LDL-vermittelte Signaltransduktion

Auf bereits zahlreiche (Partikel-)Bindungsstudien mit Thrombozyten und unterschiedlich oxidierten LDL-Spezies soll hier nicht eingegangen werden. Als die mox-LDL-Wirkung vermittelnder Rezeptor konnte jüngst das Glykoprotein IIb-IIIa ausgeschlossen werden, u.a. da die Thrombozyten thrombasthenischer, d.h. Gp IIb-IIIa-defizienter Spender, auf mox-LDL identisch reagierten wie die Kontrollplättchen Gesunder (Maschberger et al., 2000). Dies ist um so bemerkenswerter, als in der Literatur oftmals gerade dieses Integrin als wichtige LDL-bindende Struktur auf Thrombozyten beziffert wird. Auch die Beteiligung bestimmter Lipidrezeptoren, beispielsweise des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF), konnte widerlegt werden (Weidtmann et al., 1995); hierauf wird im Ergebnisteil noch weiter eingegangen werden. Im Gegensatz zur mox-LDL-induzierten Aggregation spielt für die Auslösung des Gestaltwandels die thrombozytäre Phospholipase A_2 (PLA_2), die Zyklusoxxygenase (COX) sowie der EP/ TXA_2 -Rezeptor keine Rolle (Baumann-Siemons, 2000). Ebenso findet sich keine signifikante Verminderung des Formwandels durch Hemmung der Proteinkinase C (Hemmstoff: Ro-31-8220). Hingegen hatten Erniedrigungen des intrazellulären Kalziumspiegels mit BAPTA-AM bzw. BAPTA-AM/EGTA eine gewisse Verzögerung der Plättchenantwort zur Folge; allerdings scheint ein Anstieg zytosolischen Ca^{2+} für den Formwandel nicht essentiell zu sein (Maschberger et al., 2000).

Bedeutung thrombozytärer Protein-Tyrosinkinasen

Den Stellenwert von Proteinkinasen für eine differenzierte Regulation der Funktion von (Säuger-) Zellen kann man daran einschätzen, daß $\geq 1\%$ sämtlicher Gene eines Organismus für sie kodieren. Sie bilden zusammen mit einer Reihe weiterer Konstituenten, wie den kleinen GTP-bindenden Proteinen, ein komplexes Netzwerk gezielt angreifender Phosphorylierungskaskaden, die meist in einen bestimmten Endpunkt, eine spezifische physiologische Reaktion der Zelle münden. Sie bilden damit eine unverzichtbare Ergänzung zu den »großen« Second-messenger-Systemen, wie z.B. den Spiegeln von cAMP oder Ca^{2+} . Man unterscheidet zwischen Serin-Threonin-Kinasen und Tyrosinkinasen, die jeweils Reste der namensgebenden Aminosäuren ihrer Proteinsubstrate phosphorylieren.

Die Hemmung thrombozytärer Protein-Tyrosinkinasen via Genistein unterbindet die Induktion des Formwandel durch Agonisten wie den partiellen Thrombinrezeptor-Agonisten YFLLRNP und eben auch mox-LDL (Negrescu et al., 1995). Überraschenderweise scheint aber auch die Tyrosinphosphorylierung von P62, P68, P130 und Syk keine Voraussetzung für den Formwandel zu sein; vielmehr scheint die Aktivierung von Src-Kinasen und die nachfolgende Stimulierung von Syk einen Weg zur Aktivierung des Glykoprotein IIb-IIIa darzustellen (Bauer et al., 2001).

LPA-vermittelte Signaltransduktion

Relativ reichhaltig sind die Ergebnisse zu LPA-induzierten Signalkaskaden in Fibroblasten, die maßgeblich von der Gruppe um W. H. Moolenaar erarbeitet wurden. Demnach stimuliert LPA mindestens über die G-Proteine G_i , G_q und $G_{12/13}$:

1. Über G_i wird dabei die Adenylatzyklase gehemmt; dieser Weg läßt sich am Fibroblasten durch Pertussistoxin (PTX) unterbinden (Moolenaar et al., 1997). Parallel findet sich die Aktivierung von MAP-Kinasen bzw. eine Genaktivierung via G_i , Tyrosinkinasen und Ras.
2. Eine Phosphoinositid-Hydrolyse (IP_3 /DG-Produktion) mit nachfolgender Kalziummobilisation und Stimulation der PKC wird PTX-insensitiv über G_q vermittelt.
3. Über $G_{12/13}$ findet die Aktivierung der GTPase Rho und damit der Rho-Kinase statt, was zur Phosphorylierung einer der Myosin-Leichtketten (MLC), zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts, und damit zu morphologischen Veränderungen der Zelle führt (Formwandel, Migration).

Nach Erstellen der vorliegenden Arbeit wurde die LPA-vermittelte Signaltransduktion auch in Thrombozyten untersucht. Insbesondere bestätigte sich die Rho-vermittelte MLC-Phosphorylierung und der dadurch vermittelte Gestaltwandel (Retzer und Essler, 2000).

In Abbildung 3 ist ein Schema der zentralen Elemente der LPA-induzierten Signalkaskade angeführt.

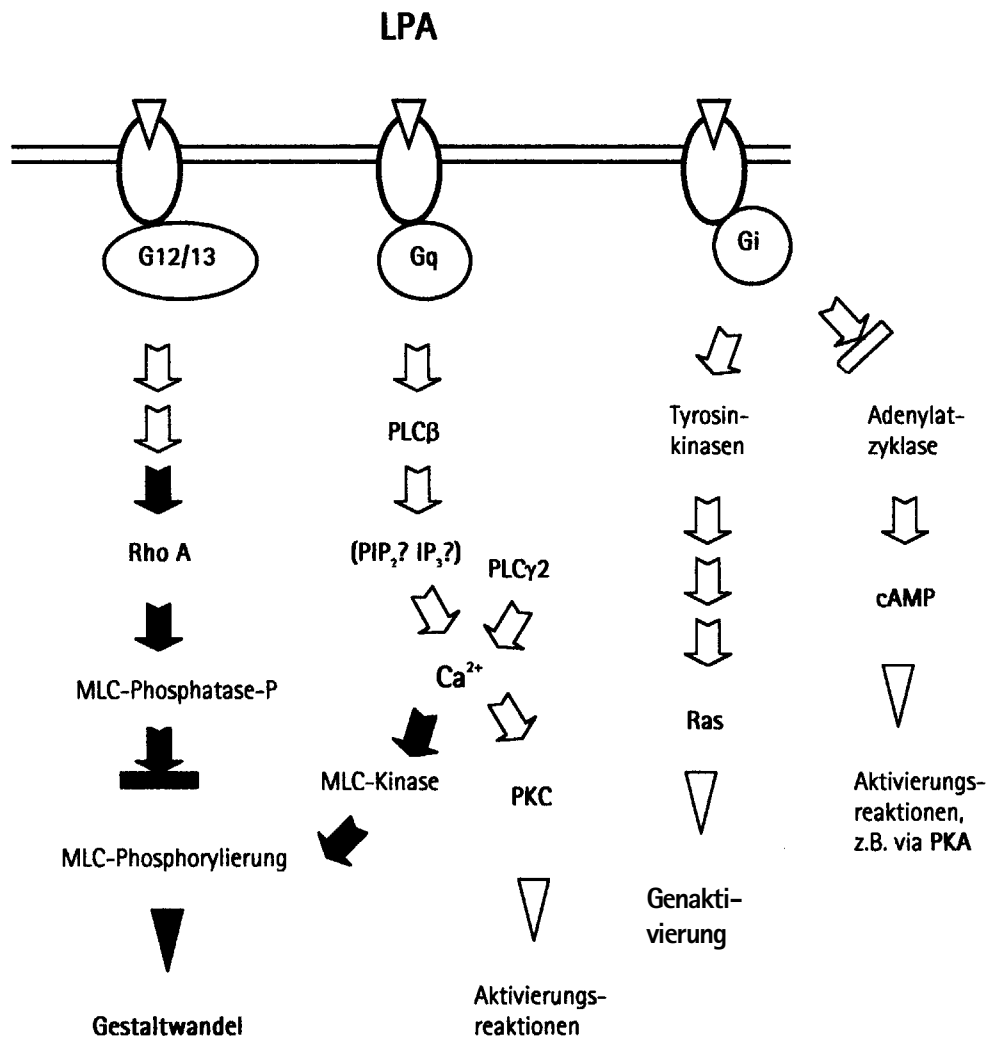


Abb. 3: Zentrale Elemente der LPA-induzierten Signalkaskade

Das Schema zeigt eine mögliche Verknüpfung von Signalelementen nach Aktivierung von LPA-Rezeptoren. Auf der linken Seite (dunkel unterlegt) sind die nach heutigen Erkenntnissen auch in Thrombozyten vorhandenen Strukturen dargestellt. Die übrigen Elemente stellen schlüssige, aber noch unbewiesene Ergänzungen auch aus anderen Zellsystemen dar. Im unteren Teil des Schemas sind die postulierten Effekte angeführt.

Desensibilisierung

Die zeitabhängige, reversible Adaptation an hohe Konzentrationen eines signalisierenden Liganden ermöglicht es einer Effektorzelle, ihre Empfindlichkeit auf das Ausmaß des Reizes einzustellen und dadurch über einen großen Bereich auf prozentuale Veränderungen der Reizintensität (Agonisten-/Ligandenkonzentration) zu reagieren. Allgemeines Prinzip für diesen

Desensibilisierung benannten Vorgang ist eine negative Rückkopplung, die mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung einsetzt. Zwei wesentliche Formen lassen sich unterscheiden:

1. Rasche Phosphorylierung aktivierter Rezeptoren mit dadurch bedingter Inaktivierung derselben und Inaktivierung von G-Proteinen, meist gefolgt von der Internalisierung des Rezeptorkomplexes.
2. Veränderung der Ausprägung der den G-Proteinen nachgeschalteten Signaltransduktoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die rasche, d.h. innerhalb weniger Minuten vonstatten gehende, und spezifische (in der Literatur auch oft als homolog bezeichnete) Desensibilisierung als Hilfsmittel benutzt, die Identität einzelner Agonisten aufzuzeigen, insbesondere der Thrombozyten-aktivierenden Substanz in milde oxidierten Lipoproteinen.

Als an derartigen Adaptionsmechanismen beteiligte funktionelle Gruppe von Proteinen sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) gut untersucht, zuerst am Beispiel des β_2 -adrenergen Rezeptors, der die Adenylzyklase via G_s stimuliert. Hier wird der aktivierte Rezeptor zum Substrat einer β -adrenergen Kinase (= GRK), die dessen zytoplasmatisch-karboxyterminales Ende an mehreren Serin- und Threoninresten phosphoryliert. Dieses phosphorylierte Ende bindet ein Hemmprotein, das β -Arrestin, was den Rezeptor daran hindert, G_s zu aktivieren (Haunsdorff et al., 1990). Dieses Hemmprinzip wurde inzwischen bei einer Reihe von G-Protein-gekoppelten Signalwegen nachgewiesen (Lefkowitz, 1993). Häufig folgt darauf die ebenfalls rasch vonstatten gehende Internalisierung des Rezeptorkomplexes, der dann entweder in Lysosomen degradiert wird oder zurück an die Plasmamembran transportiert wird (Gray und Roth, 2002). Letzteres »Recycling« führt zur Resensibilisierung der Zelle gegenüber dem betreffenden Agonisten. Die diesen Vorgängen zugrundeliegenden Mechanismen sind erst ansatzweise aufgeklärt. In neueren Arbeiten wurden erste Proteine identifiziert, die an Steuerung und Sortierung internalisierter Rezeptorkomplexe beteiligt sind: Demnach führen etwa GASP und SNX-1 präferentiell zur Degradierung (Einführung in Gray und Roth, 2002).

Ein weiteres, allerdings weniger diskutiertes Prinzip der spezifischen Desensibilisierung wird von der Proteinfamilie der Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion (RGS-Proteine) repräsentiert. Sie entfalten ihre Wirksamkeit primär, indem sie die Hydrolyse des an aktivierte G_α -Untereinheiten gebundenen GTP stimulieren und damit die Rückführung des G-Protein-assoziierten Komplexes in den inaktiven Zustand beschleunigen (Dohlman und Thorner, 1997).

Die Desensibilisierung von *Thrombozyten* gegenüber dem starken Agonisten α -Thrombin und verschiedenen partiellen Agonisten (PAF, Vasopressin, Endoperoxide) wurde von Crouch und Lapetina (1989) untersucht. Sie bezogen allerdings nachgeschaltete Desensibilisierungsmechanismen über die Proteinkinase C (PKC) in ihre Untersuchungen mit ein.

Neuere Daten sind zu ADP verfügbar: ADP stimuliert Plättchen über zwei Rezeptoren, nämlich den G_q -gekoppelten $P2Y_1$ -Rezeptor, was u.a. zum thrombozytären Formwandel führt und den G_i -gekoppelten $P2Y_{12}$ -Rezeptor, der durch Clopidogrel gehemmt werden kann. Interessanterweise findet sich eine Desensibilisierung nur des $P2Y_1$ -Rezeptors, dessen Internalisierung nach ADP-Gabe inzwischen nachgewiesen werden konnte (Baurand et al., 2000), während der $P2Y_{12}/G_i$ -Signalweg mit konsekutiver Hemmung der Adenylatzyklase nicht desensibilisierbar ist.

Hochinteressant im Kontext der vorliegenden Arbeit sind frühe Ergebnisse von Schumacher et al. (1979), in denen gezeigt wurde, daß LPA den wirksamen Bestandteil gealterten Serums darstellt – genauer gesagt der damals so bezeichneten »Depressor-aktiven Substanz« (DAS). Diese Bezeichnung ergab sich, da die Aktivität gealterten Serums im Tierversuch festgestellt wurde, wo sich nach seiner Injektion bei Katzen ein ausgeprägter Blutdruckabfall aufgrund pulmonaler Embolisation fand, welche wiederum auf eine initiale Thrombozytenaggregation zurückgeführt werden konnte. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zwischen DAS und LPA spezifische Tachyphylaxieerscheinungen nachweisen, gerade auch an menschlichen Thrombozyten. Es wurde des weiteren beschrieben, daß nur die Plättchen von Mensch und Katze durch DAS oder LPA zur Aggregation gebracht werden können, nicht jedoch die von Schwein, Hund, Kaninchen, Meerschweinchen oder Ratte.

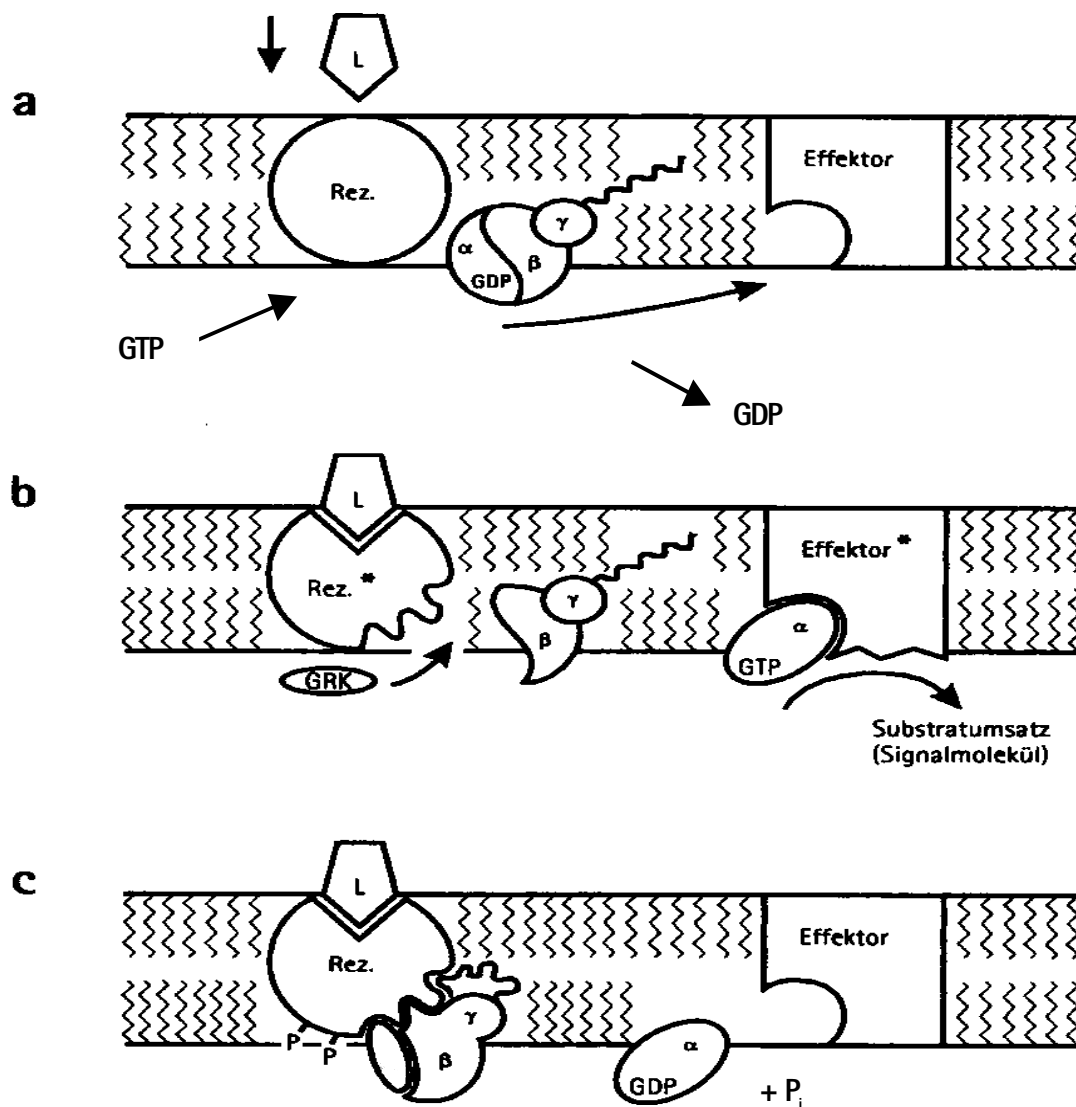


Abb. 4: Schema der Rezeptorinaktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK)

Nach ligandeninduzierter Aktivierung eines Rezeptors und des zugehörigen G-Proteins (a) dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit vom Rezeptorkomplex ab, um einen benachbarten Effektor zu aktivieren; dieser bildet weitere Signalmoleküle. In seiner aktiven Konformation kann der Rezeptor nun von GRK phosphoryliert werden (b). Als Folge davon kann sich ein weiteres Protein (Arrestin) an den Komplex anlagern, wodurch der Eintritt in einen neuen Aktivierungszyklus verhindert wird, vermutlich indem über sterische Mechanismen die Reassoziierung mit der $G\alpha$ -Untereinheit verhindert wird (c). Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor ist solange desensibilisiert (Schema in Anlehnung an Lefkowitz, 1993).

Ein RGS-Protein würde durch Stimulation der Hydrolyse des an die $G\alpha$ -assoziierten GTP zu GDP den Schritt von (b) nach (c) beschleunigen (Dohlman und Thorner, 1997).

6. Die HDL-assoziierten Enzyme Paraoxonase und PAF-Azetylhydrolase

Mehreren HDL-assoziierten Enzymen, die Reaktionen an Phospholipiden katalysieren, wird die Fähigkeit zugeschrieben, den Prozeß der Lipidoxidation zu beeinflussen (Mackness und Durrington, 1995). Die zahlreichen Untersuchungen zu diesem Themenkomplex in der Literatur benennen insbesondere eine LDL- und HDL-assoziierte Azetylhydrolase (PAF-Azetylhydrolase, kurz PAF-AH; Watson et al., 2/1995) sowie die vorwiegend HDL-assoziierte Paraoxonase (kurz PON; Watson et al., 12/1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Hemmversuche dieser beiden Enzyme durchgeführt.

Das HDL-assoziierte Enzym Paraoxonase

Der Name Paraoxonase erklärt sich historisch, da das aus Säugerserum isolierte Enzym zuerst anhand der Hydrolyse des künstlichen Orthophosphatesters Paraoxon (Diethyl-p-Nitrophenyl-Phosphat, DENP, E 600) klassifiziert wurde. In den folgenden Jahren charakterisierte die Gruppe um E. G. Erdös diese A-Esterase (»A« für Aryl- bzw. aromatisch) näher, ohne weitergehende Erkenntnisse über deren physiologische Bedeutung zu gewinnen (Erdös et al., 1959). Ihre Ergebnisse über zuverlässige Inaktivierungsmethoden, ergänzt durch neuere Untersuchungen, bildeten die Basis für die in der vorliegenden Arbeit verwendete Inaktivierung durch Kalziumentzug. Gil et al. (1995) zeigten das Maximum der Enzymaktivität bei ca. 4mM Ca^{2+} und nur minimale Aktivität bei Ca^{2+} -Konzentrationen von weniger als 1mM. Darüber hinaus wiesen sie nach längerfristigen Inkubationen mit EDTA (bis 21 Stunden) dauerhafte Einbußen der Enzymaktivität nach. Eine Bedeutung anderer Kationen schlossen sie aus.

Wie man heute weiß, ist die Paraoxonase (Aryldialkylphosphatase, EC 3.1.8.1) weitestgehend HDL-assoziiert (Mackness et al., 1993). Untersuchungen zum Genpolymorphismus korrelierten das PON-B-Allel mit einem erhöhten Arterioskloserisiko unter Diabetikern und Nichtdiabetikern. PON-Null-Knockoutmäuse zeigen u.a. ein signifikant gesteigertes aortales Plaquewachstum unter fettreicher Diät (Shih et al., 1998). Bei Patienten nach durchgemachtem Myokardinfarkt fand sich im Mittel eine geringere Enzymaktivität als in der Kontrollgruppe (Übersicht: Mackness und Durrington, 1995). Experimentell gestützte Überlegungen verknüpften dies mit einem PON-katalysierten Abbau von oxidierten Phosphatidylcholinen, insbesondere solchen mit einer kurzen Azygruppe an der sn-2-Position (Watson et al., 1995).

Das Lipoprotein-assoziierte Enzym PAF-Azetylhydrolase

Die PAF-Azetylhydrolase findet sich ausschließlich in der Lipoproteinfraktion und ist dort zu etwa zwei Dritteln mit LDL und zu einem Drittel mit HDL assoziiert (Mackness und Durrington, 1995). Sie stellt eine sezernierte, Ca^{2+} -unabhängige Phospholipase A_2 dar, spezifisch für Phospholipide mit einer kurzen Azetylgruppe an der sn-2 Position, wie sie eben auch der Plättchen-aktivierende Faktor (1-O-Alkyl-2-Azetyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin, PAF) aufweist. Bereits diese Fähigkeit, PAF zu degradieren und damit unwirksam zu machen, weist auf die bedeutsame antiinflammatorische Potenz dieses Enzyms hin. Entsprechend vermindert rekombinante PAF-AH signifikant die Gefäßleckage bei Pleuritis bzw. peripheren Ödemen im Tierversuch (Tjoelker et al., 1995).

Von verschiedenen Gruppen wird die Bildung PAF-ähnlicher Lipide während der Lipoproteinoxidation postuliert (Stremmler et al., 1989; Heery et al., 1995), weswegen der PAF-AH eine zentrale Rolle zur Prävention der verstärkten Wirksamwerdung solch bioaktiver Verbindungen im Arterioskleroseprozeß zugeschrieben wird. Die Gruppe um U. P. Steinbrecher hingegen fand durch PAF-AH-Inhibition während der Oxidation zwar eine verminderte Hydrolyse von Phospholipiden, aber keine Beeinflussung der mutmaßlich arterioskleroserelevanten Parameter (Steinbrecher und Pritchard, 1989). Andere Gruppen vermuteten im Gegensatz dazu atherogene Eigenschaften der PAF-AH, da durch ihr Wirken Lysophosphatidylcholin (LPC) produziert werde; diese Hypothese findet Unterstützung in einer neueren klinischen Studie, der zufolge erhöhte PAF-AH-Spiegel einen starken, unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung darstellt (Packard et al., 2000).

III. Fragestellung und Zielsetzung

Den Interaktionen nativer und oxidierter Lipoproteinspezies mit Thrombozyten wird eine gewichtige Rolle im Arterioskleroseprozeß zugesprochen, und dies über die gesamte Spanne von den ersten Schritten, wo die Plättchen an ein vorgeschädigtes Endothel adhären und mit ihm wechselwirken, bis zu den klinisch bedeutsamen Stadien des thrombotischen bzw. thromboembolischen Gefäßverschlusses. Dennoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen weitgehend unklar, die Literatur teilweise widersprüchlich.

Die wichtigsten in der vorliegenden Arbeit angegangenen *Fragen* waren:

1. Unterscheiden sich HDL, die Subgruppen HDL₂ bzw. HDL₃ und LDL in ihrer Wirkung auf Thrombozyten, sind sie in analoger Weise zu oxidieren und welche biologische Wirksamkeit haben diese modifizierten Formen?
2. Welcher Natur ist der Hemmechanismus nativer Lipoproteine?
3. Ist die Thrombozyten-aktivierende Substanz in mox-LDL und mox-HDL identisch?
4. Welches ist die Thrombozyten-aktivierende Substanz in milde oxidierten Lipoproteinen?
Welche Strategie ist am effizientesten zur Klärung dieser Fragestellung?
5. Welche Mengen an Lysophosphatidsäure (LPA) sind in LDL und HDL enthalten, welche biologische Aktivität hat diese und reichen jene zur Erklärung der Thrombozyten-aktivierenden Wirkung milde oxidierten Lipoproteine aus? Welche Wege sind denkbar zur Klärung dieser Fragestellung?
6. Sind spezifische LPA-Rezeptorantagonisten an humanen Thrombozyten erfolgreich einsetzbar?
7. Enthält LDL noch weitere Thrombozyten-aktivierende Lipide?
8. Gibt es Wirkunterschiede zwischen reiner LPA und der Lipoprotein-assoziierten LPA? Sind die Signalwege und die Plättchenantworten identisch?
9. Sind die Ergebnisse auf andere Arten der Lipoproteinmodifikation übertragbar?

Entsprechend war das *Hauptziel* der vorliegenden Arbeit die Identifikation der Thrombozyten-aktivierenden Substanz in milde oxidierten Lipoproteinen.

B. Materialien und Methoden

I. Materialien

Acrylamid	Amresco, Solon, Ohio, USA
ADP: Adenosin-5-diphosphat	Sigma, Deisenhofen
Adrenalin-Bitartrat	Sigma, Deisenhofen
1-Amino-2-hydroxy-naphthalin-4-sulfonsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumhexamolybdat	Merck, Darmstadt
Anti-Maus-Antikörper	Amersham, Braunschweig
Anti-PY-Antikörper 4G10	Upstate Biotechnology, Lake placid, NY, USA
Anti-PY-Antikörper PY20	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Apo A-I (lyophilisiert)	P. G. Lerch, Zentrallaboratorium, Bern
Apyrase (ADPase)	Sigma, Deisenhofen
Argon (Gas)	Linde, Höllriegelskreuth
Aspirin: Azetylsalizylsäure	Fluka / Sigma Aldrich, Deisenhofen
Azeton	Merck, Darmstadt
BHT: Butyliertes Hydroxytoluen	Sigma, Deisenhofen
Blutabnahmematerialien	Standardmaterialien des Innenstadtlinikums
BSA: Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
BSA-delipidisiert	Sigma, Deisenhofen
1-Butanol	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma, Deisenhofen
Chloroform: CHCl ₃	Baker, Griesheim
Cholesterin liquicolor rapid (Enzymatischer Farbstest)	Rolf Greiner BioChemica
D-(+)-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Dialyseschlauch, MWCO 12-14000	Schultheiß, München
2', 7'-Dichlorofluorescein-Sprayreagenz	Sigma, Deisenhofen
DMSO: Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
DTT: Dithiotreitol	Sigma, Deisenhofen
ε-Aminocaproensäure	Sigma, Deisenhofen
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
EGTA: Ethylenglykoltetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Eisessig: CH ₃ COOH (absolut)	Merck, Darmstadt
Ethanol: C ₂ H ₅ OH	Baker, Griesheim; Merck, Darmstadt
Fat-Rot 7B (Elektrophorese-Färbeset)	Ciba Corning
Folin Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd (25% in Wasser, steril, unter Argon)	Serva / Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Hepes: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure	Sigma, Deisenhofen
4-Hydroxynonenal	Sigma, Deisenhofen
Iloprost	Schering AG
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Jod (doppelt sublimiert)	Merck, Darmstadt
KBr	Sigma, Deisenhofen
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat: CuSO ₄	Sigma, Deisenhofen

L- α -Phosphatidsäure: 1, 2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphat	Sigma, Deisenhofen
LPC: Lysophosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Malachitgrün-Assay	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA
Malondialdehyd: Tetramethoxypropan	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Baker, Griesheim; Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, Deisenhofen
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
NaN ₃ : Natriumazid	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Cocodylat	A. J. Reininger, Inst. f. Anatomie, TU-München
Natriumdisulfit: Na ₂ S ₂ O ₅	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidplättchen	Merck, Darmstadt
Natriumsulfit: Na ₂ SO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumtartrat	Merck, Darmstadt
NPSerPA: N-Palmitoyl-Serin-Phosphorsäure	R. Bittman, Queens College, New York
NPTyrPA: N-Palmitoyl-Tyrosin-Phosphorsäure	R. Bittman, Queens College, New York
Oleoyl-LPA: 1-Oleoyl-sn-glycero-3-phosphat	Sigma, Deisenhofen
Oleoyl-LPA: 1-[Oleoyl-9, 10- ³ H]-sn-glycero-3-phosphat	NEN, Boston, MA, USA
Oxalsäure-Dihydrat	Merck, Darmstadt
PA: Phosphatidsäure	Sigma, Deisenhofen
PAF: Plättchen-aktivierender Faktor	Bachem, Heidelberg
Palmitoyl-LPA: 1-Palmitoyl-sn-glycero-3-phosphat	Alexis GmbH, Grünberg
Paraoxon: Phosphorsäure-diethyl-4-nitrophenylester	Sigma, Deisenhofen
PC: Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
Perchlorsäure: HClO ₄ (60%)	Merck, Darmstadt
PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Primulin	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure: HCl (37%, rauchend)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure: H ₂ SO ₄ (97%)	Merck, Darmstadt
SDS: Natriumdodezylsulfat	Sigma, Deisenhofen
SIN-1: 3-morpholino-sydnomin-hydrochlorid	Cassella AG, Frankfurt a. M.
Sphingosin-1-Phosphat	Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA
Stickstoff (Gas)	Linde, Höllriegelskreuth
Suramin (Germanin®)	Bayer AG, Leverkusen
Temed	Sigma, Deisenhofen
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Thrombin	Sigma, Deisenhofen
Thromboplas-Zähllösung	Sarstedt, Nümbrecht
Trichloressigsäure	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Biomol, Hamburg
Tween	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Western-Blot-Blocklösung	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Western-Blot-Fluoreszenzlösung	Pierce, Rochford, IL, USA
Western-Blot-Membranen: Hybond-C super	Amersham, Braunschweig
YFLLRNP	Bachem, Heidelberg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

II. Präparation und Modifikation der Lipoproteine

1. Präparation nativer Lipoproteine

Von gesunden 20- bis 35-jährigen freiwilligen Spendern, die eine Medikamenteneinnahme während der letzten beiden Wochen sowie eine Nahrungsaufnahme innerhalb der letzten 12 Stunden verneinten, wurden jw. 75 ml venöses Blut entnommen, mit 4%-iger EDTA-Lösung antikoaguliert und sofort mit einer Reihe von Zentrifugationsschritten bei jw. 10°C weiterverarbeitet: bei 1850 g für 15 min.; das gewonnene Plasma ebenfalls bei 1850 g für 5 min.; der neuerliche Überstand bei 13000 rpm für 10 min. in einer Beckman L5-50 bzw. -55 Ultrazentrifuge mit SW 40 Ausschwing-Rotor. Dieses Verfahren (nach Schulz et al., 1995) gewährleistete eine schonende sukzessive Abtrennung des Plasmas von allen zellulären Bestandteilen unter Vermeidung einer Freisetzung derer aktiver Substanzen, welche in unseren Bioassays hätten interferieren können. Von einem kleinen Aliquot des Plasmas wurden Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterin sowie Triglyzeride bestimmt, der Rest mit KBr auf eine Dichte von 1,41 g/ml eingestellt und in mit Azeton und destilliertem Wasser gereinigte Polyallomer-Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckmann, 14ml) gegeben, typischerweise 4,5 ml Plasma pro Röhrchen. Sodann wurde mit einem dreistufigen Dichtegradienten (1,080 g/ml: 3,5ml, 1,050 g/ml: 3ml und 1,000 g/ml: 3ml) überschichtet, von denen jeder EDTA (0,24mM) als Oxidationsschutz enthielt. LDL, HDL₂ und HDL₃ wurden über eine 22-stündige Ultrazentrifugation in o.a. Ausschwing-Rotor abgetrennt (siehe Abbildung 5, nächste Seite) und dann bei 4°C in Dunkelheit dreimal 6-8 Stunden gegen jw. 5 l Stickstoff-gesättigten Puffer (pH 7,4) dialysiert, der NaCl (150 mM), EDTA (0,24 mM) und Chloramphenicol (0,15 mM) enthielt. Die so gewonnenen nativen Lipoproteine wurden bis zum Versuch für maximal eine Woche nach Blutabnahme bei 4°C in Dunkelheit und Stickstoff-überschichtet gelagert.

Von einem kleinen Aliquot des Plasmas wurden Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterin sowie Triglyzeride bestimmt (Enzymatischer Farbstest, Rolf Greiner, BioChemica; Ergebnisse: Tabelle 5, nächste Seite).

Der Proteingehalt der dialysierten Lipoproteine wurde nach M. A. K. Markwell et al. (1978), einer leicht modifizierten Lowry-Prozedur, bestimmt und betrug typischerweise für LDL und für HDL₂ jw. 1,5 g/l sowie für HDL₃ 3,0 g/l. Die Eichkurve wurde jeweils mittels BSA bestimmt, zur Qualitätskontrolle fand Serodos (Rolf Greiner, BioChemica) Verwendung.

Tab. 5: Serumlipide der Blutspenderinnen und Blutspender

[mg/dl]	Spenderinnen (n = 7)	Spender (n = 5)
Gesamtcholesterin:	180 ± 28	206 ± 27
LDL-Cholesterin:	97 ± 30	143 ± 24
HDL-Cholesterin:	57 ± 13	46 ± 3
Triglyzeride:	67 ± 20	87 ± 3

Stichprobenhaft wurden die Lipidprofile der Blutspenderinnen und Blutspender erhoben. Die Werte sind angegeben in MW ± SA.

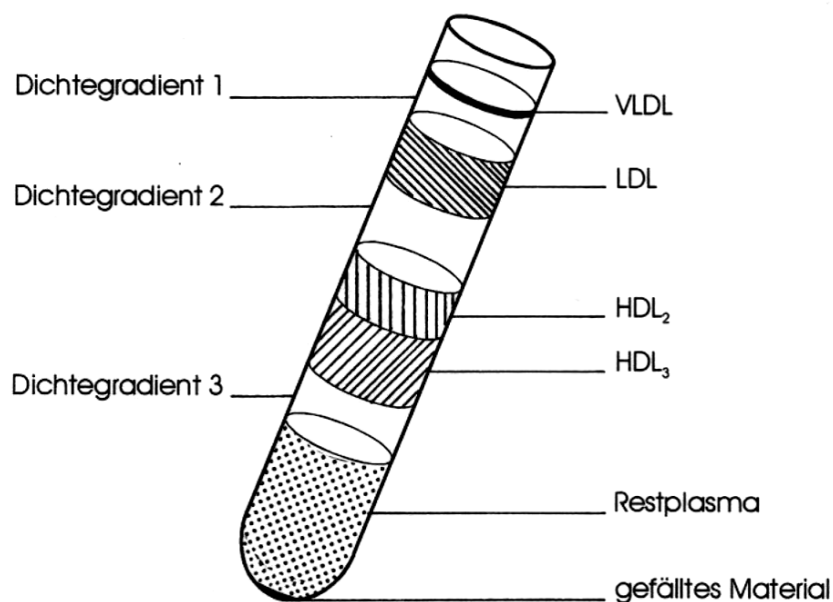


Abb. 5: Lipoproteinauftrennung (Kurzzeitpräparation)

Die Skizze zeigt ein Zentrifugenröhrchen mit den separierten Lipoproteinen nach 22-stündiger Ultrazentrifugation. Die Lipoproteinbanden konnten dann von der Röhrchenöffnung aus aspiriert werden.

2. Modifikation der Lipoproteine

Milde oxidiertes LDL (mox-LDL) und mittels 3-Morpholino-Sydnonimin-Hydrochlorid leicht oxidiertes LDL (SIN-1-LDL) wurden aus via Säulenpassagen (Econo-Pac 10DG, Bio-Rad) von EDTA befreitem nativen LDL (20 g Protein/l) durch Inkubation mit CuSO_4 (640 μM) bzw. SIN-1 (10 mM) für 20-24 Stunden bei 37°C nach der Methode von Weidtmann et al. (1995) hergestellt. Die Präparation von mox-HDL verlief völlig analog, nur daß zum Konzentrieren des EDTA-freien HDL Centricon-30-Konzentratoren (Amicon, Inc. USA) mit einer Membran geringerer Porenweite verwendet wurden, welche nur für Substanzen ≤ 30 kDa durchlässig ist.

Minimal modifiziertes LDL (mm-LDL; Berliner et al., 1990) wurde durch spontane Autooxidation nativen LDLs gewonnen: Entweder durch längerfristige Lagerung (mehrere Wochen bis wenige Monate) bei 4°C unter Anwesenheit von 0,24 mM EDTA (Verfahren 1), mittelfristige Lagerung (eine bis wenige Wochen) ohne EDTA (Verfahren 2) oder durch 24-stündige Inkubation am Luftsauerstoff unter ständigem vorsichtigen Schütteln in einem Eppendorf-Thermomixer auf niedrigster Stufe ohne EDTA bei 37°C (Verfahren 3). Im letzteren Falle wurden die geöffneten Cups mit einer eingestochenen Folie bedeckt, um ein Eintrocknen zu verhindern.

Für die Herstellung stärker oxidierten LDLs wurde EDTA-freies LDL in einer Konzentration von 0,8 g Protein/l mit CuSO_4 (20 μM) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert, wie von Y. Takahashi et al. 1996 beschrieben (ox_1 -LDL). Analog wurde das noch stärker oxidierte ox_5 -LDL präpariert, nur daß die Inkubation bei einer LDL-Konzentration von 0,4 g Protein/l stattfand. Diese Lipoproteinlösungen wurden anschließend in Centricon- bzw. Centriprep-Konzentratoren entsprechender Größe auf einsatzfähige Konzentrationen aufkonzentriert.

3. Physikochemische Eigenschaften der modifizierten Lipoproteine

Agarosegel-Elektrophorese

Die oxidationsbedingte Veränderung des Proteinanteils der Lipoproteine wurde durch Agarosegel-Elektrophorese (Ciba Corning, USA) entsprechend der Noble-Methode (1968) ermittelt. Der dabei verwendete Farbstoff (Fat-Rot 7B) färbt die ungesättigten Fettsäuren der Lipoprotein-assoziierten Lipide, wodurch indirekt die einzelnen, je nach Molekulargewicht und Ladung unterschiedlich weit gewanderten Proteinbanden zur Darstellung kommen.

Diene und Triene

Diese Hydroperoxide mit zwei bzw. drei konjugierten Doppelbindungen absorbieren UV-Licht ($\lambda_{\text{Dien}} = 234 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Trien}} = 270 \text{ nm}$) und können somit direkt photometrisch quantifiziert werden, wozu das jeweilige Lipoprotein in PBS (50 mg Protein/l) in Quarzküvetten pipettiert und in einem Uvicon 930-Spektralphotometer (Fa. Kontron, Neufahrn, Deutschland) vermessen wurde. Nur bei SIN-1-LDL ergeben diese Messungen keinen Sinn, da SIN im Trienbereich selbst absorbiert.

4. Enzymhemmungen

Hemmung der HDL-assoziierten Paraoxonase

Die verschiedenen Isoformen der Paraoxonase (PON) benötigen in unterschiedlichem Ausmaß Kalzium. Die Aktivität des plasmaständigen und HDL-assoziierten Typus geht bei einer Kalziumkonzentration $\leq 1 \text{ mM}$ gegen Null. Zusätzlich wurde nach längerer Inkubation mit EDTA (21 Stunden, Raumtemperatur) keine Reaktivierung der Paraoxonase durch die Zugabe freien Kalziums festgestellt, was durch strukturelle Veränderungen des Enzyms erklärt wird (Gil et al., 1994). Für orientierende Versuche wurde in Ca^{2+} -freiem PBS (KCl 2,7mM; KHPO_4 1,5mM; NaCl 137mM; NaHPO_4 8mM) aufgenommenes HDL_3 (1 g/l Proteinanteil) mit 3 mM EDTA unter Stickstoff für 90 min. bei 37 °C im Eppendorf Thermomixer bei leichtem Schütteln inkubiert, das EDTA nach dem für die Lipoproteinoxidation beschriebenen Verfahren über Econo-Pac-Säulen mittels Ca^{2+} -freien PBS abgetrennt und das HDL_3 für nachfolgende Versuche an gewaschenen Thrombozyten verwendet.

Hemmung der PAF-Azetylhydrolase

Zur Hemmung der PAF-Azetylhydrolase (PAF-AH) wurde HDL_3 (1 g/l Proteinanteil) mit 3 mM PMSF (Stammlösung in Ethanol) unter Stickstoff für 90 min. bei 37 °C im Eppendorf-Thermomixer bei leichtem Schütteln inkubiert. Die Abtrennung über Econo-Pac-Säulen erfolgte wie oben beschrieben.

Alternativ wurde HDL_3 (1,5 g/l) mit Paraoxon (= DENP, E 600; 1mM; Stamm in DMSO), einem Substrat der PON und Inhibitor der PAF-AH, durch eine einstündige Inkubation bei 37°C blockiert; anschließend erfolgte eine Passage über Econo-Pac-Säulen wie beschrieben. Aufgrund

der hohen Toxizität von Paraoxon (u.a. Cholinesterase-Inhibitor, Katabolit von Parathion) fanden diese Schritte unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen statt.

Gemeinsame Hemmung von Paraoxonase und PAF-Azetylhydrolase

Zur gemeinsamen Inaktivierung von PON und PAF-AH wurde in Ca^{2+} -freiem PBS aufgenommenes HDL₃ (1 g/l) zunächst zur Hemmung der PON wie beschrieben mit 3 mM EDTA unter Stickstoff für 90 min. bei 37 °C im Thermoblock bei leichtem Schütteln inkubiert. Bei ausgeschalteter PON wurde nun auch die PAF-AH mittels Paraoxon blockiert (60 min., 37 °C).

Alternativ wurde eine Hitzeinaktivierung beider Enzyme (mit geringer Präferenz der Paraoxonase) durchgeführt, indem HDL₃ (Ausgangskonzentration aus der Lipoproteinpräparation) unter Stickstoff für 10 min. (Simeon und Pavkovic, 1993) bzw. 40 min. (Gil et al., 1994) bei 56 °C im Thermoblock inkubiert wurde.

III. *In-vitro*-Studien an Thrombozyten

1. Thrombozytenpräparation

Zur Herstellung einer Suspension gewaschener Thrombozyten wurden gesunden 20- bis 35-jährigen freiwilligen Spendern, die eine Medikamenteneinnahme während der letzten zwei Wochen verneinten, 100-200 ml venöses Blut entnommen und mit 3,8%-iger Trinatriumzitrat-Lösung 1:10 antikoaguliert. Das Blut wurde bei 180 g und Raumtemperatur für 20 min. zentrifugiert, um Erythrozyten und Leukozyten abzutrennen, das so gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) abpipettiert und entweder für die Untersuchungen zum thrombozytären Gestaltwandel mit Azetylsalizylsäure (ASS, 1mM) und Apyrase (ADPase-Aktivität 0,6 U/l) für 15 min. bei 37°C inkubiert und sodann entweder (Verfahren 1) mit Zitronensäure (9 mM) und EDTA (5 mM) versehen oder (Verfahren 2) für die Aggregationsversuche mit Iloprost (100nM) für 10 min. bei 37°C inkubiert. ASS und Apyrase im ersten Verfahren verhinderten zuverlässig eine spätere Zykllooxygenase-vermittelte Aggregation bzw. erhielten die Sensibilität der

Thrombozyten gegenüber ADP vollständig (durch dessen raschen Abbau und Verhinderung der Desensibilisierung der thrombozytären ADP-Rezeptoren); das saure Milieu bzw. EDTA verhinderte eine eventuelle Bindung von Fibrinogen an seinen Rezeptor und die damit verbundene Mikroaggregat-Bildung. Das stabile Prostazyklin-Analogon Iloprost im zweiten Verfahren diente der Vermeidung einer Thrombozytenaktivierung während der Präparation (Siess und Lapetina, 1990).

Das PRP wurde sodann bei 800 g und Raumtemperatur 20 min. zentrifugiert und das gewonnene Thrombozyten-Pellet im ersten Verfahren vorsichtig in einem auf 37°C vorgewärmten leicht sauren Waschpuffer (pH 6,2) resuspendiert, der Hepes (20 mM), NaCl (138 mM), KCl (2,9 mM), MgCl₂ (1 mM), Glukose (5 mM) und Apyrase (0,6 U/l) enthält. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 min. bei 800 g wurde das Pellet erneut in einem Puffer resuspendiert, der sich vom Waschpuffer nur durch den pH-Wert von 7,4 unterschied, die Zellzahl auf 500 000/μl eingestellt (Thromboplus Tz-Speziallösung; Neubauer-Zählkammer) und die Suspension für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur gelagert. Dadurch sollte sichergestellt werden, daß eventuelle Voraktivierungen und Desensibilisierungen abgeklungen waren.

Im zweiten Verfahren wurde analog vorgegangen, allerdings enthielten die Puffer keine Apyrase; zur Aggregationsmessung wurden wenn nicht anders angegeben kurz vor Versuchsbeginn zusätzlich 2% plättchenarmes Plasma (PPP) zugefügt, welches durch eine zweischrittige Zentrifugation aus dem Restblut gewonnen wurde und als Fibrin- und Fibrinogenquelle diente. In einzelnen Durchgängen wurden die Thrombozyten zusätzlich mit 1 mM Kalzium oder einem Gemisch von 1 mM Kalzium und 10 μM ADP vorstimuliert.

2. Thrombozytärer Gestaltwandel und Aggregation

Standardmessungen und Desensibilisierung

Die Aktivierung der Thrombozyten wurde in einem 2-Kanal-Aggregometer (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) mit variabler Verstärkung gemessen, indem Proben von jw. 350-500 μl der Thrombozytensuspension in Aggregometerküvetten zunächst für 5 min. bei 37°C inkubiert und dann für weitere 2 min. bei 37°C mit 1100 rpm gerührt wurden. Sodann erfolgte die Zugabe des jw. Agonisten (dabei: LPA-Stammlösung in Ethanol 1mM) und der thrombozytäre Gestaltwandel wurde über die Änderung der Lichttransmission gemessen und aufgezeichnet. Zu

festgelegten Zeitpunkten wurden Aliquots für die Mikroskopie oder die Quantifizierung der Tyrosinphosphorylierung via Western-Blot abgenommen. Als Vergleichswert wurde für jede Thrombozytensuspension der maximal mögliche Gestaltwandel bestimmt. Dazu wurde eine Probe mit EGTA (2 mM) für 20 min. bei 37 °C inkubiert, um etwaige interferierende Mikroaggregationen zuverlässig zu verhindern (Dissoziation des Glykoprotein IIb-IIIa-Komplexes), und deutlich überschwellig mit 10 µM ADP stimuliert.

Um das Ausmaß der Desensibilisierung zu bestimmen, wurde die jw. Probe dann für eine je nach Fragestellung variable Zeitspanne (typischerweise 5-10 min.) beiseite gestellt und vor der erneuten Stimulation für 1 min. gerührt (siehe Abbildung 6).

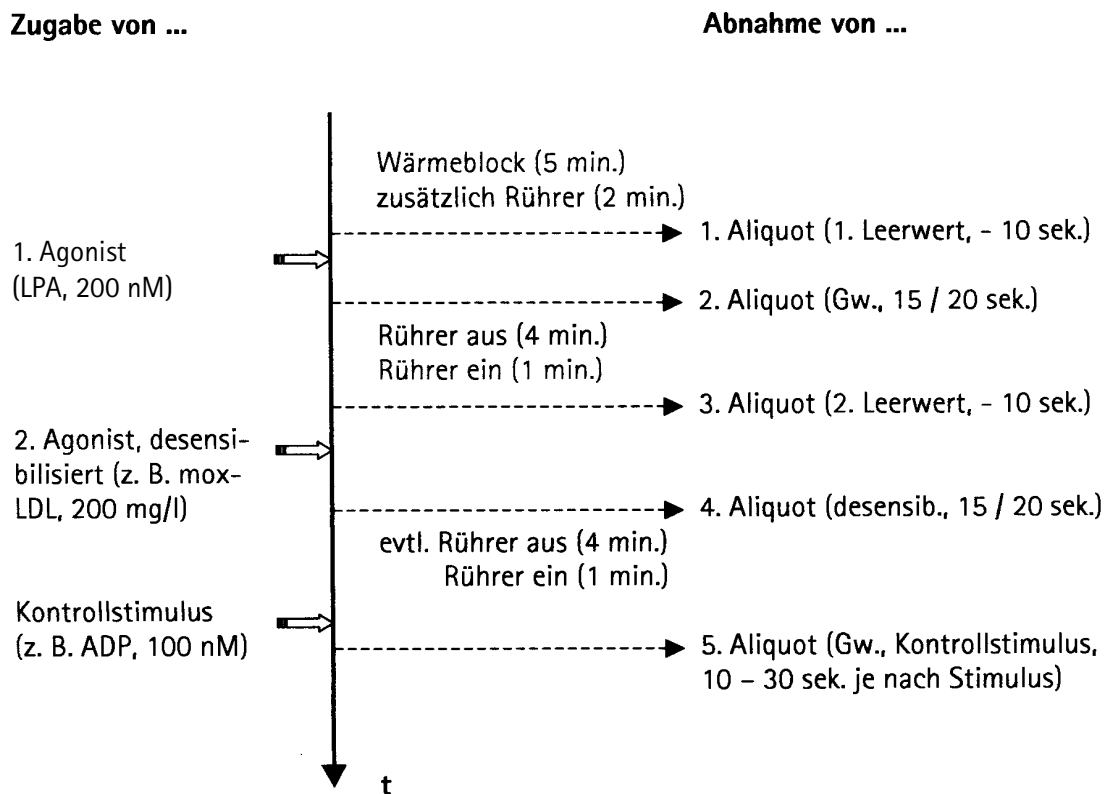


Abb. 6: Zeitlicher Ablauf eines Desensibilisierungsversuches

Die Abbildung skizziert die Abfolge von Zugaben (linke Seite) und Abnahmen (rechte Seite) während eines typischen Desensibilisierungsversuches im Aggregometer.

Aggregometermessungen mit LPA-Rezeptorantagonisten

Bei der Arbeit mit den von R. Bittman synthetisierten LPA-Rezeptorantagonisten (Bittmann et al. und Liliom et al., 1996) wurde die Probe unter Rühren und optischer Kontrolle bei 37°C mit N-Palmitoyl-Tyrosin- (NPTyrPA, siehe Abbildung 2, S. 18; Stammlösung 10mM in Ethanol) bzw. seltener auch N-Palmitoyl-Serin-Phosphorsäure (NPSerPA; Stammlösung 5 mM in Ethanol) versetzt, weiterhin unter Rühren für 2-5 min. inkubiert und die Reaktion auf den zu prüfenden Agonisten vermessen. Durchgängig wurden Negativkontrollen mit ADP und YFLLRNP durchgeführt.

Aggregometermessungen mit LPA-angereicherten Lipoproteinen

Zum Test, ob die alleinige Anwesenheit von LPA in Lipoproteinen zur Aktivierung von Thrombozyten ausreicht, wurde natives LDL bzw. HDL mit LPA angereichert (anr-LDL bzw. anr-HDL).

Dazu wurde jw. kurz vor Durchführung der Aggregometerversuche Palmitoyl-LPA in frischen Eppendorf-Röhrchen vorgelegt, nat-LDL bzw. nat-HDL dazugegeben und unter vorsichtiger Bewegung für 10-15 min. bei 37°C inkubiert. Beispielsweise wurde für einen Versuch mit anr-LDL einer finalen LPA-Konzentration (in der Plättchensuspension) von 1µM folgendermaßen verfahren: Vorlage von 1µl der LPA-Stammlösung (1mM in Ethanol), Zugabe von nat-LDL (200 µg Protein), Inkubation. Werden nun 40% des Volumens zur Plättchensuspension gegeben, so ergeben sich final 200 mg/l LDL-Anteil und 1µM LPA-Anteil (bei 5 nmol LPA pro mg LDL-Protein).

Zur Bestimmung des Grades der LPA-Inkorporation in das eigentliche Lipoproteinpartikel wurde an jw. 600 µl anr-LDL, das in der angegebenen Weise mit einer Mischung unmarkierter und tritierter LPA (1: 1000 bzw. 1: 10000; 1 nmol/mg bzw. 10 nmol/mg) angereichert worden war, eine Säulenpassage mittels Econopak-10DG-Säulen durchgeführt und das in 25µl-Aliquots fraktionierte Säuleneluat am Flüssig-Szintillationszähler (Wallac 1410, Pharmacia) vermessen. Es fanden sich nur Spuren von LPA im Medium (d.h. in den Fraktionen > Nr. 10), aber jw. 80-90 % LDL-assoziiert (Fraktionen Nr. 5-9; siehe Abbildung 7).

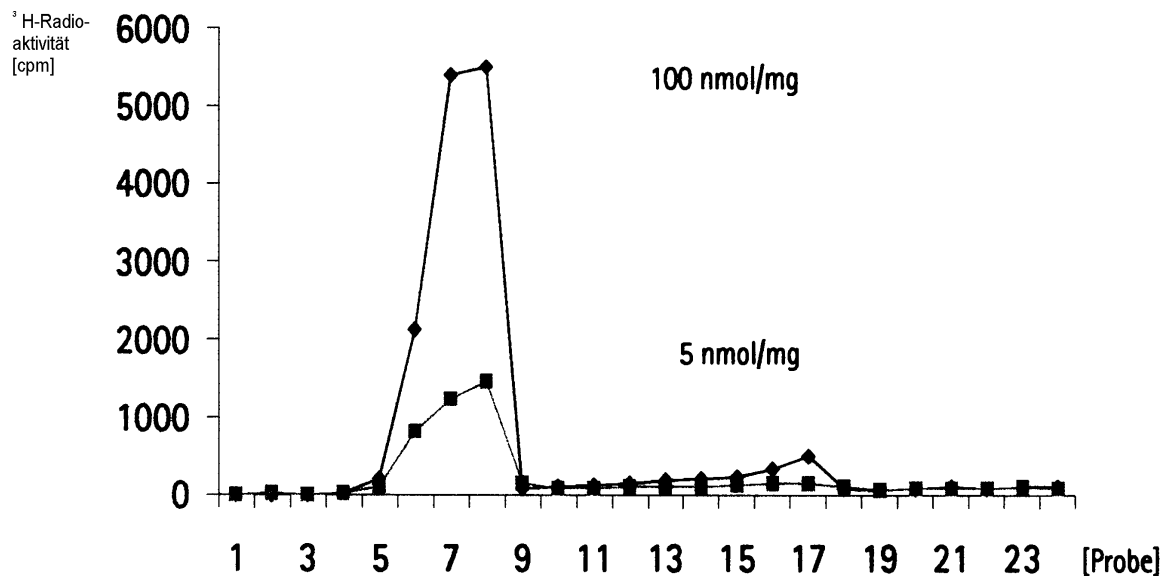


Abb. 7: Inkorporation von exogener Lysophosphatidsäure in natives LDL

Ein Gemisch von tritierter und unmarkierter LPA wurde mit nat-LDL_x inkubiert (finale Konzentrationen von 5 bzw. 100 nmol/mg). Die nicht inkorporierte LPA wurde sodann mittels einer Säulenpassage abgetrennt und die Aktivität des fraktionierten Säuleneluats am Szintillationszähler gemessen. In den Proben 5-9 findet sich die LDL-assoziierte Aktivität – dem inkorporierten LPA entsprechend, in den Proben 14-18 ist der nicht-inkorporierte Anteil zu erkennen.

3. Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskopie

Zur Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden Aliquots (50 µl) der Plättchensuspension in Fixationslösung (450 µl) transferiert, welche Glutaraldehyd (2,5 %) und Natrium Cacodylat (75 mM) enthielt. Die weitere Probenverarbeitung und die Aufnahmen wurden von Dr. Reininger am anatomischen Institut der TU München durchgeführt. Der Vollständigkeit halber soll das Prinzip hier kurz skizziert sein: Die Thrombozyten wurden auf Glasplättchen zentrifugiert und in einer aufsteigenden Ethanol-Serie dehydriert. Nach einer Trocknung auf den kritischen Punkt mit Kohlendioxid wurde die Probe mit Gold bedampft und an einem REM-Mikroskop visualisiert (Maschberger et al., 2000).

Zusätzlich zu den eigentlichen REM-Proben wurden eine Vielzahl weiterer repräsentativer Aliquots in der obengenannten Fixationslösung aufgenommen, jw. 5-7 µl auf Objektträger gegeben und am optischen Mikroskop (Leica RDM 3) im Phasenkontrast bei maximaler

Vergrößerung (Ölimmersion) untersucht. Dies diente insbesondere der Unterscheidung zwischen durch Lipide stark aktivierten und lysierten Thrombozyten.

4. Trennung der Thrombozytenproteine und Messung der Proteintyrosinphosphorylierung

Die Proteine aus der Plättchensuspension wurden wie beschrieben mittels SDS-PAGE auf Gelen mit 1,5 mm x 20 cm x 16 cm in einem vertikalen System (Bio-Rad) getrennt, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und detektiert (Maschberger et al., 2000; nach Negrescu et al., 1995; ausführliche Beschreibungen in vorangegangenen Dissertationen des Instituts):

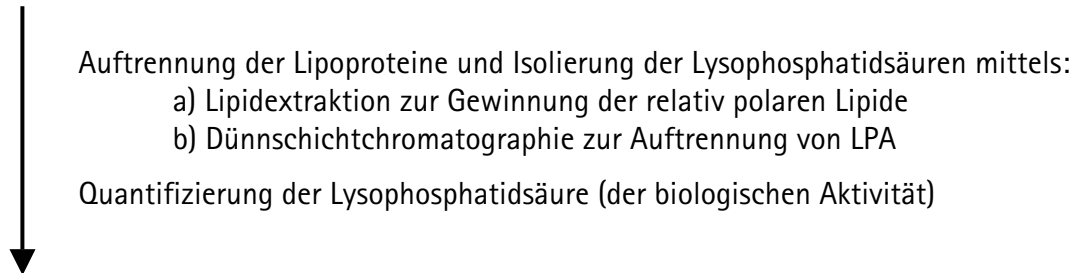
Aliquots der 1:1 in zweifachem Laemmlipuffer aufgenommenen und bei 95°C erhitzten Proben durchliefen zunächst ein schmales Band eines vierprozentigen Sammelgels und wurden danach in achtprozentigem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde durch ca. ein- bis zweistündiges Fokussieren abgeschlossen. Für das anschließende Blotten diente ein LKB 2117 Multiphor, semidry. Die Membran wurde dann mit BSA (5%) geblockt und mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte der Nachweis von an Tyrosin phosphorylierten Proteinen. Die Verdünnung der vermischten primären Anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY20 und 4G10 betrugen jw. 1 : 2000 in TBST, die Verdünnung der Meerrettichperoxidase-gebundenen sekundären Antikörpers (Anti-Maus-Ig) betrug 1 : 15 000. Die Blots wurden mittels Chemoluminiszenz auf Röntgenfilm visualisiert.

5. Analyse der Ergebnisse

Der Gestaltwandel wurde absolut am maximalen Schreiberausschlag in cm gemessen; Besonderheiten bzgl. Oszillationsverminderung oder Anstiegssteilheit werden – falls gegeben – diskutiert. Die geblotteten Proteinbanden wurden per Densitometrie (Sharp JX 325 und Ultrosan XL, Pharmacia) gemessen. Die Daten sind in der gesamten Arbeit soweit nicht anders angegeben dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SA) der einzelnen Experimente von verschiedenen Blutspendern.

IV. Quantifizierung der Lysophosphatidsäuren in Lipoproteinen

Prinzip:



1. Sequentielle Lipidextraktion

Zunächst wurde eine Lipidextraktion der nativen bzw. modifizierten Lipoproteine durchgeführt, mit dem Ziel, den LPA-Anteil quantitativ und möglichst vollständig zu extrahieren, bei gleichzeitiger Elimination von Proteinanteil bzw. später störenden Neutralfetten und Phospholipiden. Bei der Entwicklung des zweischrittigen Verfahrens (siehe Abbildung 8, S. 45) griff ich auf Ergebnisse zurück von K. S. Bjerve et al., 1974. Sämtliche Schritte erfolgten unter Stickstoff, zur Vermeidung artifizieller Lipidoxidation.

Eliminierung der Neutralfette

In einem ersten Schritt wurden mit einer leicht modifizierten neutralen Extraktion nach E. G. Bligh und W. J. Dyer (1959) die Neutralfette und ein Großteil der Phosphatidylcholine in die untere Chloroform-Methanolphase extrahiert, während LPA nahezu vollständig (90-95%) mit dem Proteininterface und der oberen Wasser-Methanolphase assoziiert blieb.

Dazu wurden die nativen Lipoproteine bei 4°C und mit 1mM EDTA als Oxidationsschutz durch Centricon-100 bzw. -30 Konzentratoren auf 3 mg/ml (Ziel) aufkonzentriert, so daß sich ein Ausgangsvolumen von unter 1 ml pro Extraktionsröhrchen ergab. Die milde oxidierten Lipoproteine wurden mit Dialysepuffer auf 3 mg/ml verdünnt. Anschließend wurden beide Proben mittels erneuter Proteinbestimmung überprüft (Ausgleich von Verlusten während des Konzentrationsvorgangs) und gegebenenfalls korrigiert auf gleiche Stoffmenge (typischerweise 1,2 mg) sowie auf gleiches Volumen (typischerweise 0,4 ml). Sodann wurde der EDTA-Gehalt aller

Proben auf 1mM eingestellt, 1 ml Chloroform mit BHT (50 mg/l) als Antioxidans sowie 2 ml Methanol zugegeben und kräftig gevortext. In diesem Stadium wurden jw. ca. 4000 Bq. entsprechend 1,9 pmol tritierter Lysophosphatidsäure [Oleoyl-9,10-³H]-LPA in Chloroform/Methanol (1 : 2) als Tracer für Recoverymessungen und zur späteren LPA-Detektion auf den Dünnschichtplatten zugegeben und nach vortexen und 10 min. ruhen der Ausgangswert am Flüssig-Szintillationszähler (Wallac 1410, Pharmacia) bestimmt. Nach Zugabe von 1 ml Wasser und weiteren 3 ml Chloroform wurden die Proben kurz bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut, sodann 10 min. bei ca. 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, wodurch sich zwei durch das Proteininterface getrennte Phasen bilden, die Chloroformphase abgezogen, und die Wasser-Methanolphase unter Stickstoff komplett eingedampft, in einzelnen Versuchen auch nur reduziert (Wasserbad bei 40°C unter Stickstoff).

Extraktion der Lysophosphatidsäure

Im zweiten Schritt schließt sich eine butanolische Extraktion des erhaltenen Proteininterface an, mit welcher das LPA möglichst rein extrahiert werden soll (Bjerve et al., 1974; Gerrard und Robinson, 1984; Watson et al., 1985; Shaikh, 1994). Dafür wurden 1 ml Wasser und 2 ml wassergesättigtes Butanol und nach einem ersten Schütteln 2,5 mM EDTA zugegeben; in einem größeren Teil der Versuche wurden die Proben zur Verbesserung der Recovery mit Salzsäure auf 20 mM (bezogen auf den Wasseranteil) angesäuert, wobei sich später auf den DC-Platten (Laufmuster) bzw. in den Versuchen (biologische Aktivität) keine qualitativen oder relativ-quantitativen Unterschiede zu den neutralen Extraktionen ergaben. Eine partielle Hydrolyse von Esterbindungen der Lipide, wie sie für z.T. höhergradige Ansäuerungen beschrieben wurden, sah ich für dieses Protokoll und bezogen auf LPA somit nicht bestätigt. Nach einer weiteren 10-minütigen Zentrifugation bei ca. 1000 g und Raumtemperatur konnte die obere Butanolphase abgezogen und in einem weiteren Röhrchen unter Stickstoff das Butanol abgedampft werden. Die verbleibenden Lipide (Lysophosphatidsäuren sowie geringe Mengen anderer Lipide) wurden in Ethanol aufgenommen und ein kleineres Aliquot dieses Extrakts zur Bestimmung der biologischen Aktivität beiseite gestellt.

2. Dünnschichtchromatographie

Zur weiteren Abtrennung der Lysophosphatidsäure von anderen Lysophospholipiden und Phosphatidsäure (PA) wurde der Extrakt auf eine Oxalsäure-imprägnierte (500 mM in Methanol, frisch zubereitet) und getrocknete Kieselgel-G-Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen (Merck, DC60 KG oder Whatman 60 Å, 250 µm Normalphasen DC-Platten mit Auftragstreifen). Hier wurde auch jw. ein kleines Aliquot zur Bestimmung der Recovery abgenommen. Als Standard liefen auf der Platte neben verschiedenen Stoffmengen an LPA (Oleoyl- oder Palmitoyl-LPA, wovon ersteres aufgrund der Doppelbindung bereits bei geringeren Stoffmengen detektierbar ist, und wovon beide praktisch auf gleicher Höhe laufen) auch Phosphatidsäure (PA), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P) zur Kontrolle mit, die je nach Laufmittel deutlich von LPA unterschiedene Rf-Werte aufweisen (siehe Tabelle 6). Meist kam ein Laufmittel nach P. Cohen, A. Derksen et al. (1971) zum Einsatz mit einem Gemisch von Chloroform, Ethanol und rauchender Salzsäure (87 : 13 : 0,5), alternativ auch das Laufmittel nach Sugiura et al. (1994) mit einem Gemisch von Chloroform, Azeton, Methanol, Eisessig und Wasser (9 : 4 : 2 : 2,6 : 1), während sich verschiedene andere, wie etwa das nach A. Tokomura, als deutlich unterlegen in Bezug auf ihre Trennschärfe erwiesen haben.

Tab. 6: Gegenüberstellung der Rf-Werte von Lysophosphatidsäure (LPA) und abzugrenzenden Lipiden in der Dünnschichtchromatographie (DC)

	Cohen & Derksen	Sugiura
LPA:	0,3	0,4
PA:	0,7	0,9
LPC:	< 0,1	-
S-1-P:	< 0,1	inkonsistent

Die Rf-Werte von LPA und anderen Lysophospholipiden bzw. Phosphatidsäure (PA) unterscheiden sich im System nach Cohen & Derksen deutlich. Sie können somit leicht voneinander abgegrenzt werden. Die Rf-Werte der LPA-Subspezies (hier Palmitoyl- und Oleoyl-LPA) sind hingegen praktisch identisch. Das sonst sehr brauchbare System nach Sugiura erbrachte bzgl. Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P) inkonsistente Ergebnisse (bei älterer S-1-P-Charge); insgesamt scheint eine graduiertere Auftrennung erreicht zu werden.

Zur Detektion der Phospholipide hat sich im Vergleich zu verschiedenen Sprays wie Primulin, Dichlorofluoreszein oder Ammoniummolybdat (theoretisch vielversprechend, wegen der Farbreaktion über die Phosphatgruppe, aber auch unspezifisch reagierend) als sensibelste und

reproduzierbarste Methode sublimiertes Jod erwiesen; zur Absicherung der dennoch oftmals verhältnismäßig schwachen Färbung wurde zusätzlich immer mit Hilfe eines automatischen DC-Linearanalysegeräts der Fa. Berthold (Bad Wildbad, Deutschland) der tritiierte LPA-Standard lokalisiert. Das Ergebnis eines typischen Laufs zeigt Abbildung 25 auf Seite 86.

3. Biologische Aktivitätsmessung von Extrakten und Eluaten

Im Vergleich mit der Aktivität oxidierter und milde oxidierter Lipoproteine sowie synthetisierter LPA-Chargen (Oleoyl- oder Palmitoyl-LPA) wurde die biologische Aktivität der aus Lipoproteinen aufgereinigten Lysophosphatidsäuren quantifiziert. Hierzu wurden die butanolischen Extrakte nach erfolgter Lipidextraktion verwendet, v.a. aber die LPA-Eluate nach der DC. Die betreffenden Spots wurden an luftzugfreiem Ort mit einem breitklingigen Skalpell von der DC-Platte gekratzt und das Kieselgel in frische Eppendorf-Röhrchen gefüllt; zusätzlich zu den eigentlichen Proben wurde auch ein auf DC-Platten aufgetragener LPA-Standard ausgekratzt und quantifiziert. Dreimal wiederholt wurden die Proben dann mit 1 ml Butanol oder alternativ 1 ml eines Gemisches von Chloroform, Methanol und Wasser (1 : 2 : 0,8 v/v) 1 Stunde bei 45°C inkubiert, darauf 5 min. bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen, eingedampft, zum Säubern der Wand in 100 µl Ethanol aufgenommen, erneut eingedampft und zuletzt in 5-10 µl eines Ethanol-Hepes-Puffers (4:1 v/v; pH 7,4) aufgenommen und die Recovery bestimmt. Diese gepufferte Lösung wurde nun für Versuche an Thrombozyten bis zu einer max. Ethanolkonzentration von 0,5% eingesetzt, wobei die endogenen LPA-Konzentrationen über eine Standardkurve (Palmitoyl-LPA, seltener auch Oleoyl-LPA) rückgerechnet und als »Äquivalenzstoffmenge« angegeben wurden (i.e. Aktivität des Extrakts/Eluats bezogen auf das Ausgangslipoprotein pro mg Proteinanteil, die der Aktivität von 1 nmol Palmitoyl-LPA entspricht).

4. Recoverymessungen mit tritierter Lysophosphatidsäure

Anhand der tritiierten Lysophosphatidsäure wurden Effektivität, Verteilungsmuster und Spezifität der gesamten LPA-Quantifizierung evaluiert. Für das genannte Protokoll ergaben sich dabei die in Abbildung 8 dargestellten Werte.

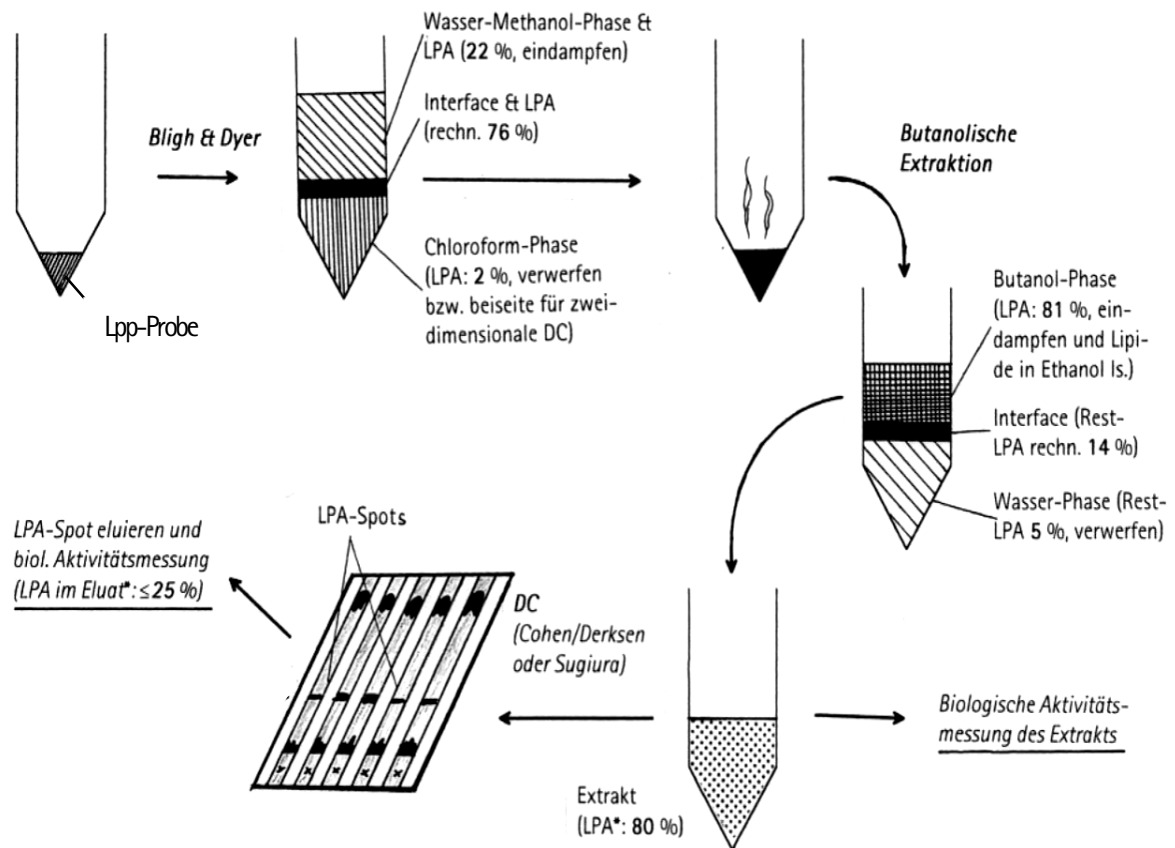


Abb. 8: Schritte der sequentiellen Lipidextraktion und der nachfolgenden Quantifizierungsmethoden

Über diese Methode läßt sich LPA sauber und effektiv isolieren und quantifizieren. Den einzelnen Schritten sind die Ergebnisse der LPA-Recoverymessungen mit Hilfe des tritiierten Standards beigeordnet (*: immer bestimmt). Es zeigt sich, daß gut dreiviertel des ursprünglichen LPA-Gehalts im butanolischen Extrakt gewonnen werden. Deutlich geringer ist die Recovery bei den Eluaten, wofür die Abtrennung von der Kieselgelmatrix eine wesentliche Ursache zu sein scheint.

5. Biologische Aktivitätsmessung der anderen Lipidgruppen

Während die Butanolphasen zur LPA-Aktivitätsmessung weiterverwendet wurden, wurde in einigen Experimenten zusätzlich die untere Chloroform-Methanolphase von nat- und mox-LDL aus dem ersten Extraktionsschritt nach E. G. Bligh und W. J. Dyer weiter in verschiedene Lipidfraktionen aufgetrennt, um deren tatsächliche biologische Inaktivität gegenüber gewaschenen Thrombozyten zu demonstrieren. Dies geschah mit Hilfe einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie in die Gruppen PC, LPC, SM, PE und PI nach T. Eichholtz et al. (1993). Die Lipidextraktion von 350 µl LDL-Suspension, hier einem Proteinanteil von 0,5 mg entsprechend, erfolgte mit einem Gemisch von Chloroform (2 ml, mit BHT 50 mg/l versetzt) und Methanol (4 ml); die Chloroformphase wurde gesammelt und die Extraktion mit 4 ml Methanol wiederholt. Die unteren Phasen der beiden Schritte wurden gepoolt, unter Stickstoff eingedampft, die gewonnenen Lipide in 25 µl Chloroform/Methanol (1:2) aufgenommen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte (Merck, DC60 KG ohne Auftragsstreifen) aufgetragen. Die zweidimensionale Trennung erfolgte mit Laufmittel 1 (CHCl_3 450 ml; CH_3OH 270 ml; H_2O 27,5 ml; NH_3 27,5 ml) und senkrecht dazu Laufmittel 2 (CHCl_3 900 ml; CH_3OH 400 ml; CH_3COOH 120 ml; H_2O 20 ml). Zur Lokalisation kam erneut sublimiertes Jod zum Einsatz. Die anschließende Elution erfolgte zweimalig mit Chloroform/Methanol (1:2) für jeweils 30 Minuten auf einem Eppendorfmixer und einmalig analog mit Chloroform/Methanol (1:4). Die Proben wurden unter Stickstoff eingedampft und zum Versuch in einer Mischung aus Hepes (20 mM, pH 7,4) in NaCl (0,9 %) und delipidisiertem BSA (molares Verhältnis von 1 : 5 zu den jeweiligen Lipiden; erwartete Lipidmengen gemäß bislang unveröffentlichter Vorergebnisse von C. Corrinth) zur Lösung gebracht und für die Versuche am Aggregometer verwendet.

C. Ergebnisse

I. Lipoprotein–Eigenwirkungen auf Thrombozyten

Zur systematischen Suche nach Wirkungen von Agonisten und Antagonisten dienten Suspensionen gewaschener Thrombozyten. Diese stellen ein ausgezeichnetes *in-vitro*-System dar, weil Fremdeinflüsse durch andere Blut- bzw. Plasmabestandteile ausgeschaltet sind. Zur quantitativen Erfassung der verschiedenen Wirkungen, wurde die initiale Plättchenreaktion, d.h. der Formwandel und die Stimulation der Proteintyrosinphosphorylierung während des Formwandels untersucht. Positive Rückkopplungsprozesse, wie die Bildung von Endoperoxiden bzw. Thromboxan A₂ und die Sekretion von ADP finden während des Formwandels nicht statt, spielen somit für diesen auch keine Rolle (Siess, 1989).

1. Eigenwirkungen nativer Lipoproteine

Natives HDL₂ und natives HDL₃

Frisches HDL (nat-HDL) aus der Kurzzeitpräparation wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, einen thrombozytären Gestalt- bzw. Formwandel (Gw., shape-change, s.c.) zu induzieren. Die Experimente wurden nach HDL₂ und HDL₃ getrennt, von Konzentrationen stark unterhalb der physiologisch üblichen, bis hin zu deutlich überhöhten durchgeführt (25 mg/l bis 5 g/l, Proteinanteil). Für den Bereich über 500 mg/l wurde das frisch dialysierte HDL noch durch einen kurzen Zentrifugationsschritt mit Centricon 30-Konzentratoren auf eine höhere Ausgangskonzentration (5–20 g/l) gebracht, um den Verdünnungseffekt während der Messungen am Aggregometer zu minimieren.

Sämtliche Messungen erbrachten *keinerlei Eigenwirkungen* von nativem HDL₂ oder nativem HDL₃ über den gesamten Dosisbereich und über das gesamte Zeitfenster (kontinuierliche

Aggregometeraufzeichnung unter Rühren bis zu maximal 30 min.; mikroskopische Kontrollen bei $t = 20$ sek., $t = 1$ min. und $t = 10$ min.) Daher werden die Daten hier auch nicht bildhaft dargestellt.

Natives LDL

Die Wirkung von nativem LDL_L (LDL aus einer längerdauernden, sequentiellen Ultrazentrifugation) war bereits Gegenstand früherer Untersuchungen. Methodische Unterschiede führten allerdings dazu, diese Ergebnisse jetzt mit nat-LDL aus der Kurzzeitpräparation ($nat-LDL_K$) zu überprüfen. Vergleiche der physikochemischen Eigenschaften und der biologischen Aktivität von LDL aus Kurz- und Langzeitpräparation legen nahe, daß es sich bei LDL_K noch um eine »nativere«, dem *in-vivo*-LDL näherstehende Form handelt: Während LDL_L fast immer eine Grundlinienverschiebung am Aggregometer in Richtung Abnahme der Lichttransmission hervorrief, oftmals sogar einen geringfügigen Gestaltwandel, konnten für LDL_K *keine Eigenwirkungen* über einen Dosisbereich von 25 mg/l bis 5 g/l und einen Zeitraum von maximal 30 min. festgestellt werden. Auch diese Daten werden deshalb hier nicht abgebildet.

2. Einfluß der Präparationsmethode auf die Lipoproteineigenschaften

Im Gegensatz zu der von mir bewußt gewählten schonenden Kurzzeitpräparation existieren zahlreiche andere Verfahren zur Gewinnung von Lipoproteinen. Bei der Aufarbeitung von scheinbar meinen Ergebnissen widersprechender Literatur stieß ich regelmäßig auf solche Unterschiede in der Präparation (siehe Tabelle 7, nächste Seite): Arbeitsgruppen, die einen aktivierenden Effekt von nativem HDL auf Plättchen, Endothelzellen oder Monozyten beschreiben, verwenden Langzeitpräparationen, meist die sequentielle Ultrazentrifugation, ungekühlt über mehrere Tage mit z.T. deutlich abweichenden Protokollen zur Plasmagewinnung und -behandlung (Schumaker und Puppione, 1986). Eine artifizielle oxidative Modifikation der Lipoproteine bereits während der Präparation ist dabei durchaus denkbar. Tatsächlich erbrachten mehrere probenhalber durchgeführte Langzeitpräparationen nach früheren Protokollen (Weidtmann et al., 1995) teilweise Plättchen-aktivierende LDL-Fraktionen von Spendern, wobei nach der Kurzzeitpräparation gewonnenes LDL jedesmal inaktiv war. Eine Eigenaktivität von nativem HDL fand sich allerdings weder nach Lang- noch nach Kurzzeitpräparation.

Tab. 7: Vergleich der Lipoproteinpräparationen mittels Ultrazentrifugation

	Langzeitpräparation	Kurzzeitpräparation
Plasmagewinnung und -behandlung:	Intensive und teilweise langwierige Plasmavorbehandlung (u.a. mit PMSF), um bei unsterilem Vorgehen Bakterienwachstum zu verhindern.	Schonend mehrschrittige und zügige Befreiung des Plasmas von Zellbestandteilen. Weiterverarbeitung dieses nativen Plasmas.
Zentrifugationsverfahren:	Sukzessive Abtrennung der Lipoproteinfraktionen mit mehrfachen Ultrazentrifugationsschritten.	Einmalige Ultrazentrifugation mit Auftrennung sämtlicher Lipoproteinfraktionen.
Dauer:	Ca. 3-5 Tage (je nach Lipidfraktion und Waschschritten)	Ca. 22 Stunden
Temperatur:	Meist Raumtemperatur (18-22°C)	Kontinuierliche Kühlung (4-10°C)
Ergebnis:	Oftmals biologisch teilaktive LDL-Präparationen, nur tendenziell höhere Ausgangs-Dien- und Trien-Gehalte	LDL und HDL praktisch immer biologisch inaktiv, allerdings nur geringgradig niedrigere Ausgangs-Dien- und Trien-Gehalte

Während die Langzeitpräparation mehrfach aktive (teiloxydierte?) LDL-Fraktionen erbrachte, erwiesen sich Lipoproteine aus der Kurzzeitpräparation als inaktiv. Bezüglich Rotationszeit und -temperatur werden in der Literatur auch Übergangsformen beschrieben.

3. Agonistische Wirkungen milde oxidierte Lipoproteine

Aggregometeruntersuchungen mit mox-LDL und mox-HDL

Milde oxidiertes LDL_K (mox-LDL_K) induzierte dosisabhängig im Bereich von 25 bis 500 mg/l einen *Gestaltwandel* isolierter, Aspirin-behandelter Plättchen. Am Aggregometer konnte eine Abnahme der Lichttransmission und eine Verringerung der Oszillationen beobachtet werden als Ausdruck der im Zuge der primären Aktivierung erfolgenden Abkuglung der Thrombozyten, d.h. ihrem Wandel von der nativ-diskoiden in die aktiviert-sphärische Form (Abbildung 9).

Bei isolierten, nicht mit Aspirin vorbehandelten Plättchen konnte ab individuell unterschiedlichen Schwellenkonzentrationen von 0,5 bis 1,5 g/l eine Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden. Im Aggregometer zeigte sich dies durch eine Zunahme der Transmission, da die Anzahl streuender Einzelpartikel abnahm (Abbildung 11, S. 53).

Mox-LDL_K (mit LDL aus der Kurzzeitpräparation) verhielt sich somit analog zu mox-LDL_L (mit LDL aus der sequentiellen Ultrazentrifugation), dessen Thrombozyten-aktivierende Wirkung aus früheren Arbeiten bekannt war (Weidtmann et al., 1995; Baumann-Siemons, 2000).

Interessanterweise zeigte analog oxidiertes HDL (mox-HDL₂ bzw. mox-HDL₃) eine ebensolche Thrombozyten-aktivierende Wirkung (Abbildung 9). Da die Absolutwerte des Gestaltwands je nach Sensitivität und Reagibilität der Thrombozytensuspension stark differieren (unterschiedliche Spender), wurde in jedem Experiment der maximale Gestaltwandel durch eine ADP-Stimulation ermittelt und zu den einzelnen Lipoprotein-induzierten Antworten ins Verhältnis gesetzt (Gw. in % des Gw._{max.}).

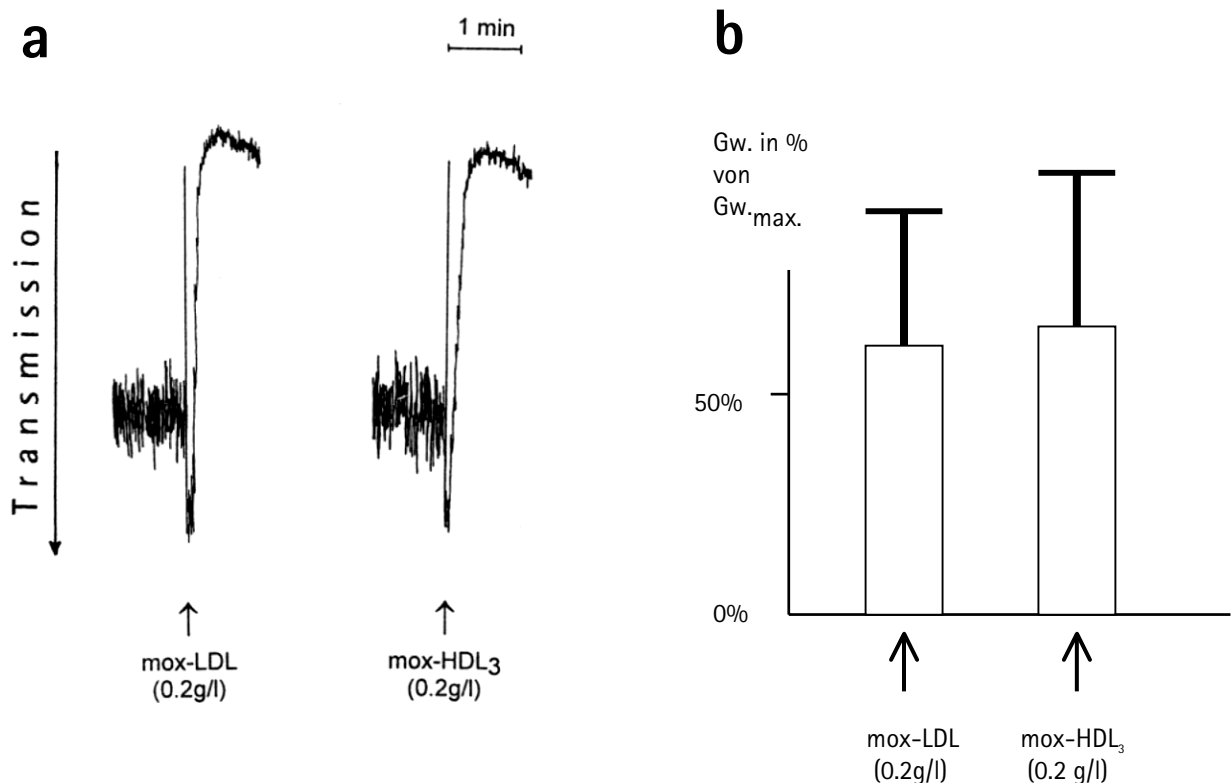


Abb. 9: Durch mox-LDL und mox-HDL induzierter thrombozytärer Formwandel

- a) Formwandel im Aggregometer, induziert durch mox-LDL_K bzw. mox-HDL₃
b) Aktivitätsunterschiede von mox-LDL_K und mox-HDL₃ im Vergleich. Hier dargestellt ist das Ausmaß des durch 0,2 g/l mox-Lpp induzierten Gw. im Verhältnis zum maximalen Gw. nach ADP-Gabe (1μM). Mittelwerte ± SA, Fallzahlen siehe Text.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Thrombozyten-aktivierenden Eigenschaften von mox-LDL, mox-HDL₂ und mox-HDL₃: Im einzelnen ergab sich für mox-LDL_K 58,8% ± 26,4% (19 verschiedene Lipoproteinpräparationen, 37 verschiedene Plättchenpräparationen) und für mox-HDL₃ 60,9% ± 30,7% (13 Lipoproteinpräparationen, 28 Plättchenpräparationen) des maximalen Formwandels (MW ± SA). Mox-HDL₂ wurde in zwei Präparationen überprüft und induzierte einen ähnlichen maximalen thrombozytären Formwandel wie mox-LDL_K oder -HDL₃.

Mit finalen Lipoproteinkonzentrationen um die 200 mg/l wurde am Aggregometer in der Regel eine knapp submaximale Transmissionsabnahme erzielt, weshalb sie als Standardddosis in den folgenden Experimenten Verwendung fand.

Morphologische Untersuchungen

Der thrombozytäre Gestaltwandel, induziert durch milde oxidierte Lipoproteine, ist im Konzentrationsbereich von 25 bis 500 mg/l für gewöhnlich reversibel. Zum Zeitpunkt der maximalen Transmissionsabnahme (ca. 25-35 sek.) entnommene Aliquots wurden am Phasenkontrastmikroskop morphologisch untersucht. Hier lassen sich tatsächliche Aktivierungsvorgänge von toxischen Reaktionen, beispielsweise einer eventuellen Zytolyse, zuverlässig unterscheiden. Sämtliche in der vorliegenden Arbeit beschriebenen agonistischen Effekte wurden auf diese Weise verifiziert. Darüber hinaus wurden morphologische Details der Aktivierungsreaktionen jeweils einer repräsentativen Probe am Rasterelektronenmikroskop untersucht; hier kann neben dem Wandel von einer diskoiden zu einer sphärischen Form auch die Ausbildung von irregulären Membranfaltungen, Invaginationen, bläschenartigen Abschnürungen und Pseudopodien dargestellt und charakterisiert werden.

Mox-LDL und mox-HDL induzierten gleichermaßen einen typischen Formwandel, wie er in bekannter Weise nach physiologischen Stimuli beobachtet wurde; zwischen mox-LDL und mox-HDL ergaben sich diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 10b und 10d, nächste Seite).

Untersuchungen zur Proteintyrosinphosphorylierung

Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurde die Phosphorylierung der Tyrosinreste von P62, P68 und P130 untersucht, um eventuelle Unterschiede in diesen frühen Stadien der Signaltransduktion feststellen zu können. Hierzu wurden Zeitverläufe an mox-HDL₃-aktivierten Thrombozyten durchgeführt und mit analog erhobenen Daten für mox-LDL_L verglichen (Baumann-Siemons, 2000).

Die Phosphorylierung der benannten Plättchenproteine veränderte sich über die Zeit in vergleichbarer Weise bei mox-LDL- und mox-HDL-Stimulation: Bei mox-HDL zeigten sich die Maximalwerte für P62 bei 30-60 sek., für P68 bei 20-30 sek. und für P130 bei 30 sek. (siehe auch Abbildung 19a, S. 73). Bei mox-LDL wurden Maxima für P62 und P68 bei 30-60 sek. und für P130 bei 30 sek. beschrieben (Baumann-Siemons, 2000).

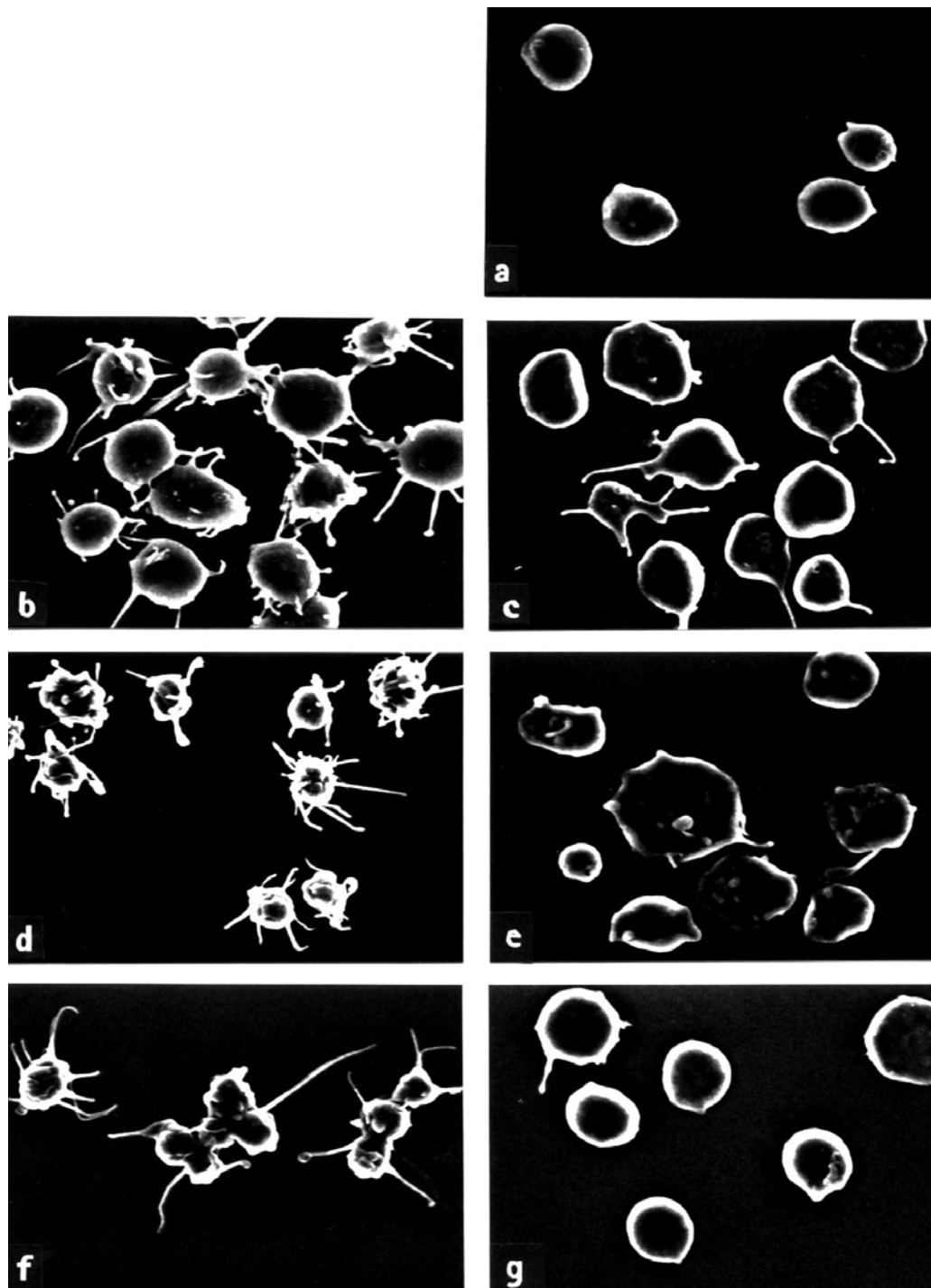


Abb. 10: Beurteilung der Plättchenmorphologie: Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop

- a) Diskoide Kontrollplättchen (nach Wärmeblock und Rührer, aber unstimuliert)
- b) Stimulation mit ox-LDL_α (200 mg/l)
- c) Stimulation mit ox-LDL_α (200 mg/l) unter Anwesenheit des LPA-Antagonisten NPTyrPA (10 μM)
- d) Stimulation mit ox-HDL_3 (200 mg/l)
- e) Stimulation mit ox-HDL_3 (200 mg/l) unter Anwesenheit des LPA-Antagonisten NPTyrPA (10 μM)
- f) Stimulation mit LPA (0,5 μM)
- g) Stimulation mit ox-LDL_α (200 mg/l) 5 min. nach Desensibilisierung durch LPA (0,5 μM)

Untersuchungen zur Aggregation

Die Untersuchungen wurden auch in nicht mit Aspirin behandelten Thrombozyten durchgeführt, um auch dem Gestaltwandel nachfolgende und positiven Rückkopplungsprozessen unterliegende Reaktionen, v.a. die Aggregation, beurteilen zu können.

Es zeigten sich *keine grundlegenden Unterschiede* zwischen mox-LDL_κ und mox-LDL_ι : mit beiden konnte in den allermeisten Fällen eine Aggregation ab einer Dosis von ca. 0,5 g/l ausgelöst werden. Hingegen konnte durch mox-HDL_3 (5 Präparationen, unterschiedl. Spender) in einem Dosisbereich von 0,5-8 g/l ohne Vorstimulierung der Thrombozyten *keine* Aggregation ausgelöst werden (Abbildung 11).

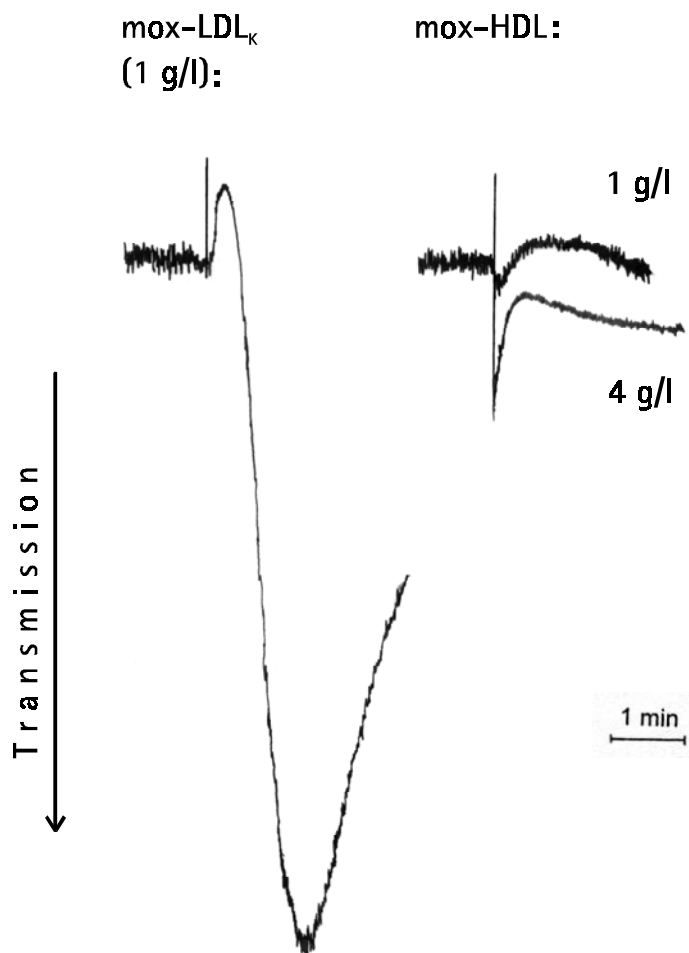


Abb. 11: Untersuchungen zur Aggregation: mox-LDL_κ und mox-HDL_3

In fünf Präparationen wurde orientierend die Potenz der einzelnen Lipoproteinpräparationen untersucht, eine Aggregation auszulösen. Im angegebenen Beispiel erfolgten die Versuche unter Anwesenheit von 2% plättchenarmem Plasma (PPP) ohne Vorstimulierung der Thrombozyten.

4. Vergleich mit anderen Verfahren der Lipoproteinmodifikation

Jedes Verfahren zur Lipoproteinmodifikation stellt nur ein Modell der Situation *in vivo* dar. Findet sich eine untersuchte Eigenschaft in *verschiedenen* Modellen *in vitro* wieder, erscheint ein Rückschluß auf die Situation *in vivo* eher zulässig. Neben dem Vergleich von Kurz- und Langzeitpräparation sowie von HDL₂ und HDL₃ wurden daher den mittels Kupfer milde oxidierten mox-Lpp auch anders modifizierte Lipoproteine gegenübergestellt:

Im Verlauf der eigenen Experimente wurden die Ergebnisse einer japanischen Arbeitsgruppe veröffentlicht, wo für eine in ihrem Oxidationsgrad wohl zwischen mox- und ox₅-LDL liegende LDL-Präparation (hier als ox₇-LDL bezeichnet) die Fähigkeit beschrieben wurde, eine Aggregation auszulösen (Takahashi et al., 1996). Nach dieser Methode oxidierte Lipoproteine wurden in der vorliegenden Arbeit ebenso untersucht, wie durch unterschiedlich lange Autooxidation unter Abwesenheit von EDTA gewonnenes mm-LDL bzw. mm-HDL sowie durch das Sydnominin SIN-1 direkt (Metallionen-unabhängig über Hydroxylradikale) oxidierte Lipoproteine.

Vergleich der physikochemischen Parameter

Der Grad der oxidativen Veränderung von Lipoproteinen kann durch die Veränderung ihrer physikochemischen Eigenschaften erfaßt werden (Witztum und Steinberg, 1991; Esterbauer et al., 1992).

Erstens erhöht sich während der Oxidation der Nettobetrag negativer Ladungen des Proteinanteils der Lipoproteine, was zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität im *Agarosegel* führt. Man begründet dies mit der Reaktion von (bei der Lipidperoxidation entstehenden) Aldehyden mit den ε -Aminogruppen von Lysinresten der Apolipoproteine – ein Vorgang, der seiner Natur nach v.a. bei intensiveren Oxidationsprozessen auftritt. Erwartungsgemäß fanden sich keine Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität bezüglich der Präparationsverfahren (LDL_K vs. LDL_L) sowie zwischen HDL₂ und HDL₃. Ebenfalls wie erwartet zeigte sich keine signifikante Änderung der Mobilität für die milde oxidierten Formen (mox-Lpp, SIN-Lpp) gegenüber den nativen (nat-Lpp), während für stärker oxidiertes LDL (ox₇-LDL) ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen war (Tabelle 8). Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß ox₇-LDL bezüglich der Stärke der Oxidation zwischen den von Weidtmann untersuchten ox₅-LDL und mox-LDL einzuordnen ist; dennoch ist die elektrophoretische Mobilität schon verschoben ($\beta \rightarrow \alpha$). Hingegen deutet die unveränderte Mobilität der milde oxidierten Lipoproteine darauf hin, daß in diesen Präparationen keine signifikante Modifikation des

Proteinanteils stattfindet. Damit wurde nachgewiesen, daß für HDL analog gilt, was für LDL_L bereits gezeigt worden war (Weidtmann et al., 1995).

Zweitens werden in der frühen Phase der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Lipoproteinen *Diene und Triene* gebildet, deren Konzentrationen nach einer anfänglichen Pause (»lag-time«), deren Länge v.a. durch den Gehalt an Antioxidantien bestimmt wird, einer charakteristischen Kinetik folgend ansteigen. Obwohl die Absolutwerte für Diene und Triene keine sicheren Prädiktoren der biologischen Aktivität darstellen, besteht eine gewisse Korrelation: Die stärksten agonistischen Effekte auf Thrombozyten wurden bei einer Veränderung der Dienabsorption während der Oxidation von $\Delta E \approx 0,3$ o.D. beschrieben (Weidtmann et al., 1995). Tatsächlich bewegen sich in diesem Bereich die ermittelten Werte der milde oxidierten Lipoprotein-Spezies, während die stark oxidierten Formen einen deutlich darüber hinausgehenden Anstieg aufweisen (Tabelle 8). Zwischen nat-LDL_K und nat-LDL_L sowie zwischen nat-HDL₂ und nat-HDL₃ sind die Unterschiede geringer als die Schwankungen zwischen den einzelnen Präparationen. Interessanterweise liegen sowohl die Dien- als auch die Trienwerte für HDL durchgehend unter denen für LDL; dies gilt sowohl in der nativen, als auch in der milde oxidierten Form und ebenso für die Veränderung während der Oxidation ΔE (Tabelle 8). Bis zu einem gewissen Grad könnte dies dadurch erklärt werden, daß die Konzentration der Lipoproteinsuspensionen über den Proteinanteil eingestellt wurde, somit der Lipidanteil bei HDL geringer war als bei LDL. Tendenziell höhere Dienwerte ergaben sich auch für mox-HDL₃ gegenüber mox-HDL₂, wobei allerdings letzteres nur zweimalig präpariert wurde (Tabelle 8b).

Tab. 8: Gegenüberstellung von zentralen physikochemischen Parametern verschiedener nativer und modifizierter Lipoproteine

a LDL-Präparationen:

	nat-LDL _K	nat-LDL _L	mox-LDL _K	mox-LDL _L	mm-LDL _K	SIN-LDL _{L/K}	ox _T -LDL _K
Elektrophorese:	β	β	$\beta \pm 0,1$	$\beta \pm 0,1$	nicht best.	$\beta \pm 0,15$	Höhe $\alpha_{1(2)}$
Diene:	0,3083 $\pm 0,0872$	0,3287 $\pm 0,0778$	0,5244 $\pm 0,1522$	0,5048 $\pm 0,1065$	0,4728	nicht best.	1,1551
$\Delta E_{\text{Dien nat} > \text{(m)ox}}$:			0,2210 $\pm 0,1216$	0,1928 $\pm 0,1201$	0,1738		0,8004
Triene:	0,0933 $\pm 0,0268$	0,0989 $\pm 0,0205$	0,2257 $\pm 0,0678$	0,2165 $\pm 0,0479$	0,1917	nicht best.	0,4338
$\Delta E_{\text{Trien nat} > \text{(m)ox}}$:			0,1324 $\pm 0,0564$	0,1176 $\pm 0,0422$	0,1086		0,3495

b HDL-Präparationen:

	nat-HDL ₂	mox-HDL ₂	nat-HDL ₃	mox-HDL ₃	mm-HDL ₃	ox _T -HDL ₃
Elektrophorese:	α_1	$\alpha_1 \pm 0,1$	α_1	$\alpha_1 \pm 0,1$	nicht best.	nicht best.
Diene:	0,2008 $\pm 0,0173$	0,2704 $\pm 0,0051$	0,2258 $\pm 0,0672$	0,3528 $\pm 0,0666$	0,4291	1,4310
$\Delta E_{\text{Dien nat} > (\text{m})\text{ox}}$:		0,0695 $\pm 0,0122$		0,1212 $\pm 0,0674$	0,2949	1,1219
Triene:	0,0547 $\pm 0,0028$	0,1263 $\pm 0,0083$	0,0566 $\pm 0,0150$	0,1341 $\pm 0,0204$	0,1177	nicht best.
$\Delta E_{\text{Trien nat} > (\text{m})\text{ox}}$:		0,0716 0,0111		0,0758 $\pm 0,0208$	0,0837	

In der Zeile zur Elektrophorese ist jw. der Bandenname angegeben, wo das entsprechende Lipoprotein wanderte; $\pm x$ bezeichnet eine mehr oder minder unscharfe Bande. Übrige Angaben in MW \pm SA. Anzahl der Präparationen: nat-LDL₁: 16, nat-LDL_K: 19, nat-HDL₂: 2, nat-HDL₃: 19; mox-LDL₁: 14, mox-LDL_K: 17, mox-HDL₂: 2, mox-HDL₃: 18. Jeweils eine Präparation bei mm-LDL_K, ox_T-LDL_K, mm-HDL₃, ox_T-HDL₃.

Vergleich der biologischen Aktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk auf die Fähigkeit zur Induktion eines Gestaltwandels gerichtet. Die in diesem Sinne geringste biologische Aktivität von im Mittel etwa 10% des maximal (mit 1 μ M ADP) induzierbaren Gw. wies mm-LDL_K auf, das mit 20 g/l einen Tag lang ohne EDTA und ohne Zugabe von Cu²⁺ bei 37°C inkubiert wurde (Verfahren 3; vgl. Seite 33). Analog präpariertes mm-HDL wies nur in einer von drei Präparationen eine gewisse Aktivität auf (im Mittel < 10% Gw._{max}). Im Gegensatz zu nat-HDL war aber auch bei den beiden scheinbar inaktiven Präparationen eine leichte plättchensensibilisierende Wirkung gegenüber anderen Agonisten festzustellen, etwa eine raschere und größere Plättchenaggregation nach Zugabe von Adrenalin 10 Sekunden später.

Potenter zeigte sich SIN-LDL_K, womit etwa ein Drittel des maximalen Gestaltwandels induziert werden konnte. Das in einer Präparation erzeugte SIN-HDL war etwas weniger bioaktiv als das entsprechende SIN-LDL.

Schwer einzuordnen ist hier das durch längerfristige Lagerung gewonnene mm-LDL (Verfahren 1 oder 2; vgl. Kapitel B, S. 33), denn damit wurden die größten Schwankungen festgestellt (nahezu inaktiv bis annähernd mox-LDL-Aktivität). Bei gleich langer Lagerung war dabei mm-LDL durchgehend potenter als mm-HDL.

Von A. Weidtmann et al. (1995) wurden systematische Untersuchungen an diversen modifizierten LDL-Spezies durchgeführt, wie weit sie eine *Aggregation* auszulösen vermochten. Wie bereits erläutert, zeigten sich SIN-LDL_L und mehr noch mox-LDL_L am aktivsten, während das stark oxidierte ox_S-LDL_L keine solche Aktivität zeigte. Bezüglich seiner Fähigkeit, eine Plättchenaggregation auszulösen, beschrieben Weidtmann et al. (1995) sozusagen ein Aktivitätsplateau bei milden Oxidationsstufen (SIN und v.a. mox). Eine im Oxidationsgrad zwischen mox- und ox_S- liegende LDL-Spezies, wie sie nach Takahashi et al. (1996) oxidiertes LDL (ox_T-LDL) darstellt, wurde damals nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden deutliche *Gestaltwandel* nach Plättchenaktivierung mit milde oxidierten Lipoproteinen nachgewiesen (mox-LDL_K: 58% und mox-HDL₃: 60% des Gw._{max}; s.o.). Das stärker oxidierte ox_T-LDL zeigte sich bezüglich des Formwandels aber ähnlich potent: Nur in einem von drei Versuchen lagen die ox_T-LDL-induzierten Gw. geringfügig unter denen von mox-LDL, in den beiden anderen sogar leicht darüber. Noch stärker oxidiertes ox_S-LDL (wie bei Weidtmann) kam in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz. Das Ausmaß der durch SIN-Lpp induzierten Formwandel lag im Mittel etwas unter dem von mox-Lpp.

Da die Ergebnisse spenderabhängig schwanken, sei hier exemplarisch ein Versuch angeführt, in dem zwei verschiedene mox-LDL_K- und jw. eine SIN- und ox_T-LDL-Präparation zur Verfügung standen:

Tab. 9: Typisches Beispiel für die Induktion eines thrombozytären Formwandels durch verschieden oxidierte LDL-Spezies

	SIN-LDL	mox-LDL 1	mox-LDL 2	ox _T -LDL
Gw. in cm	1,6	3,8	6,1	4,0
Gw. in % Gw. _{max}	24	56	91	60

Die Gestaltwandel durch oxidierte Lipoproteine differieren von Präparation zu Präparation. Hier sind beispielhaft die Ergebnisse für vier verschiedene LDL-Varianten dargestellt, die an derselben Tz.-Suspension eingesetzt wurden.

II. Hemmeffekte und Interaktionen

1. Effekte nativer Lipoproteine

Wechselwirkungen zwischen nativen Lipoproteinen und physiologischen Thrombozytenstimuli

Wir untersuchten systematisch den durch verschiedene Agonisten hervorgerufenen Gestaltwandel Aspirin-vorbehandelter Plättchen in Anwesenheit oder Abwesenheit nativer Lipoproteine. *Weder nat-LDL_K, noch nat-HDL₂, noch nat-HDL₃ veränderten den durch ADP oder den partiellen Thrombinrezeptor-Agonisten YFLLRNP induzierten Gestaltwandel.* Die getesteten Konzentrationen von nat-LDL_K und nat-HDL₃ lagen im Bereich von 25 mg/l bis 1 g/l, die von nat-HDL₂ wegen seiner geringen Ausgangskonzentration im Bereich von 25 mg/l bis 250 mg/l. Die Agonisten wurden in einem Dosisbereich knapp submaximaler Wirkung (in der Regel 500 nM ADP bzw. 300 µM YFLLRNP) eingesetzt. Die Zeitspanne zwischen der Zugabe der Lipoproteine und des jeweiligen Agonisten wurde dabei von 0 sek. (d.h. gleichzeitige Zugabe) bis 5 min. variiert; für die Zeitspanne von 15 sek. wurden auch morphologische Untersuchungen am Phasenkontrastmikroskop durchgeführt und die Proteintyrosinphosphorylierung gemessen. Diese ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bzgl. An- vs. Abwesenheit nativer Lipoproteine.

Stichprobenartig wurden am Aggregometer auch weitere Agonisten, wie Serotonin, Thrombin oder PAF untersucht, deren Aktivitäten durch nat-Lpp ebenfalls nicht signifikant beeinflusst wurden. Diese Ergebnisse werden deshalb hier nicht bildlich dargestellt.

Native Lipoproteine hemmen den Thrombozyten-aktivierenden Effekt modifizierter Lipoproteine

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den physiologischen Plättchenstimuli war der Thrombozyten-aktivierende Effekt milde oxidiert Lipoproteine durch vorherige Gaben von nativen Lipoproteinen beeinflussbar: *Natives HDL oder LDL_K hemmt jeweils die rasche Plättchenaktivierung durch mox-LDL oder mox-HDL.* Ein Hemmeffekt konnte dabei unabhängig von der Lipoproteinspezies nachgewiesen werden, d.h. nat-HDL₂, nat-HDL₃ oder auch nat-LDL_K hemmen gleichermaßen den thrombozytären Formwandel induziert durch mox-LDL_K, mox-HDL₂

oder mox-HDL₃. Ein typisches Beispiel der Aufzeichnung des Formwandels im Aggregometer ist in Abbildung 12 dargestellt.

Innerhalb jeweils eines Versuches sind die Ergebnisse ab einer Hemmstoffkonzentration von [nat-Lpp] = 200 mg/l hochsignifikant (→ vergleichbare Konzentration von nativ-hemmender und modifiziert-aktivierender Lipoproteinspezies). Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede der halbmaximalen Hemmstoffkonzentration zwischen den einzelnen Versuchen und Präparationen (Lipoprotein- und Thrombozytenpräparationen eines individuellen Spenders). Insofern lassen sich auch nach einer ganzen Serie von Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Hemmwirkung nat-LDL_K vs. nat-HDL₂ vs. nat-HDL₃ ableiten und auch keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Hemmwirkung nach Stimulation mit mox-LDL_K vs. mox-HDL₂ vs. mox-HDL₃.

Abbildung 13 zeigt den Einfluß verschiedener Konzentrationen von nat-HDL₂ (a), nat-HDL₃ (b) oder nat-LDL_K (c) auf den durch milde oxidierte Lipoproteine (mox-LDL und mox-HDL₃) induzierten Formwandel von Thrombozyten.

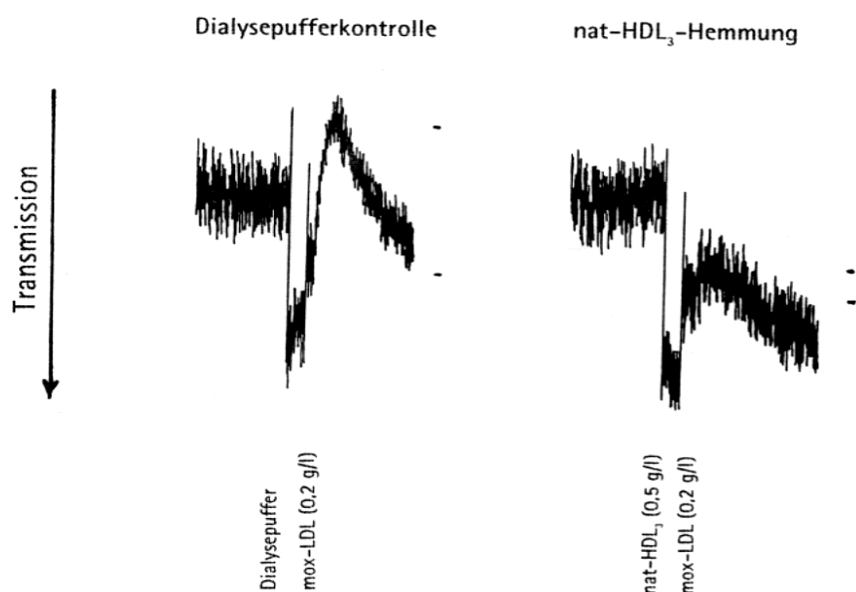
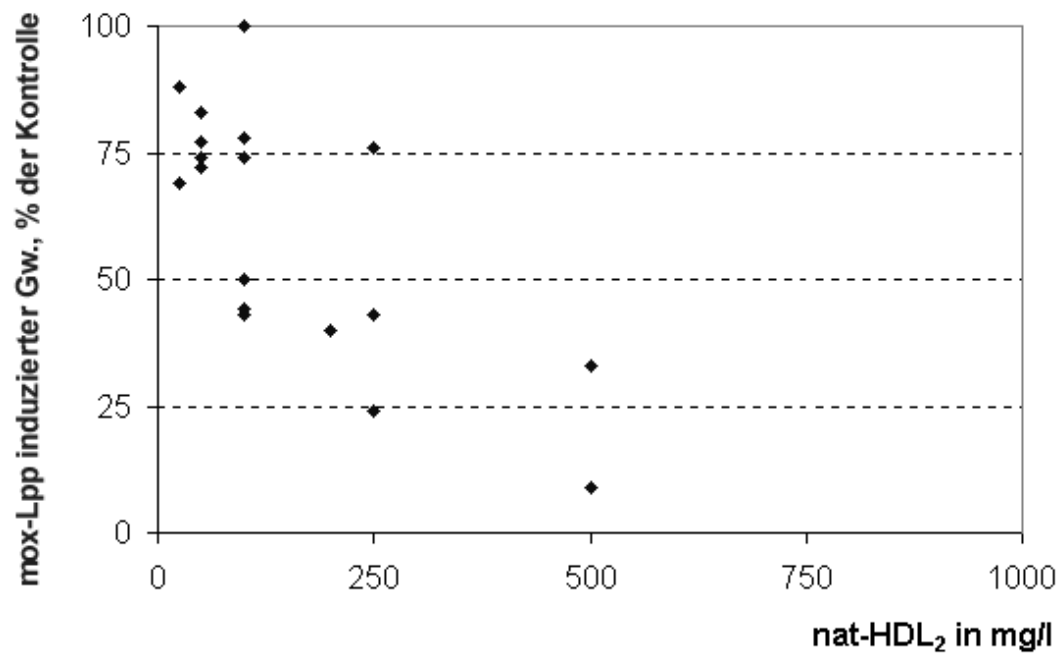


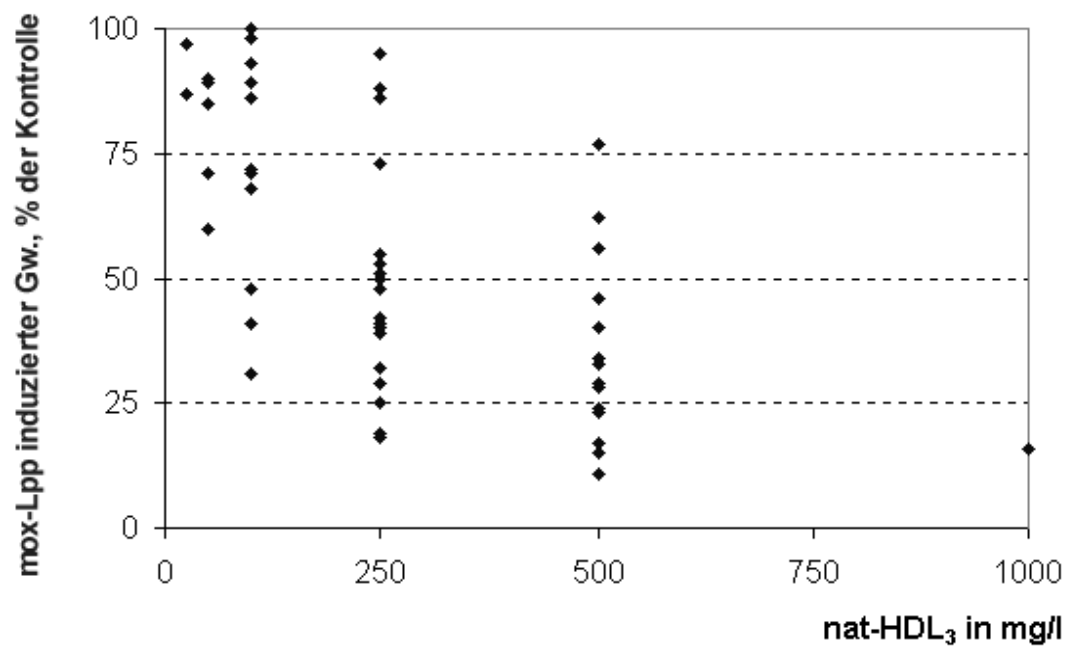
Abb. 12: Hemmung des mox-LDL-induzierten Gestaltwandels durch nat-HDL

Dargestellt ist ein typisches Beispiel des Formwandels im Aggregometer. Durch den Verdünnungseffekt bei Zugabe von Dialysepuffer bzw. nat-HDL₃ nimmt die Transmission zunächst zu; durch das konzentriertere und daher trübere mox-LDL kommt es zu einer geringen gegenläufigen Grundlinienverschiebung. Danach zeigt sich im dargestellten Beispiel bei der Kontrolle eine fast fünffach stärkere Abnahme der Transmission und eine ausgeprägtere Verringerung der Oszillationen, als nach vorheriger Gabe von nat-HDL.

a) nat-HDL₂ + mox-Lpp



b) nat-HDL₃ + mox-Lpp



C) nat-LDL_K hemmt mox-Lpp

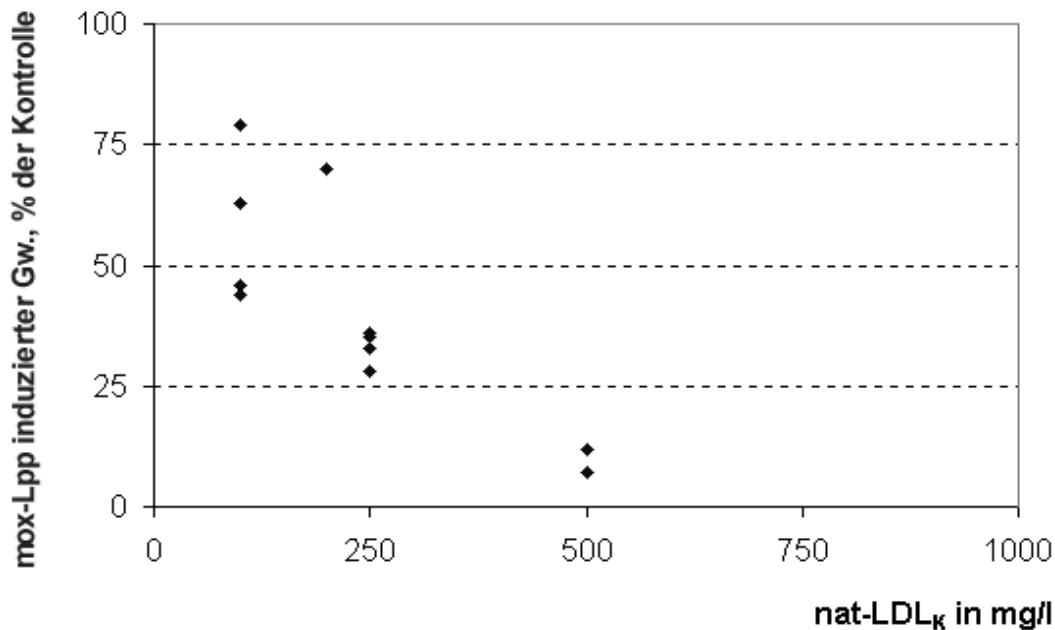


Abb. 13: Dosisabhängigkeit des Hemmeffektes von nat-Lpp auf den mox-Lpp-induzierten Formwandel

Jeder Punkt einer Abbildung gibt das Ausmaß des mox-LDL- bzw. mox-HDL₃-induzierten Gestaltwandels am Aggregometer nach Hemmung durch nat-HDL₂, nat-HDL₃ oder nat-LDL gegenüber der Dialysepufferkontrolle (100%) wieder. Der Gw. nimmt mit steigender nat-Lpp-Dosis ab.

Derselbe signifikante und dosisabhängige, je nach Präparation unterschiedliche Hemmeffekt zeigte sich in einzelnen Untersuchungen mit mm-LDL oder ox_r-LDL als Agonisten.

Für den beschriebenen Hemmeffekt bestand keine Zeitabhängigkeit, d.h. unabhängig davon, ob nat-Lpp und mox-Lpp gleichzeitig oder mit einer Verzögerung von 15 sek. bis sogar 60 min. der Plättchensuspension zugegeben wurden, ergab sich eine quantitativ identische Reduktion des mox-Lpp-induzierten Gestaltwandels (nicht bildlich dargestellt).

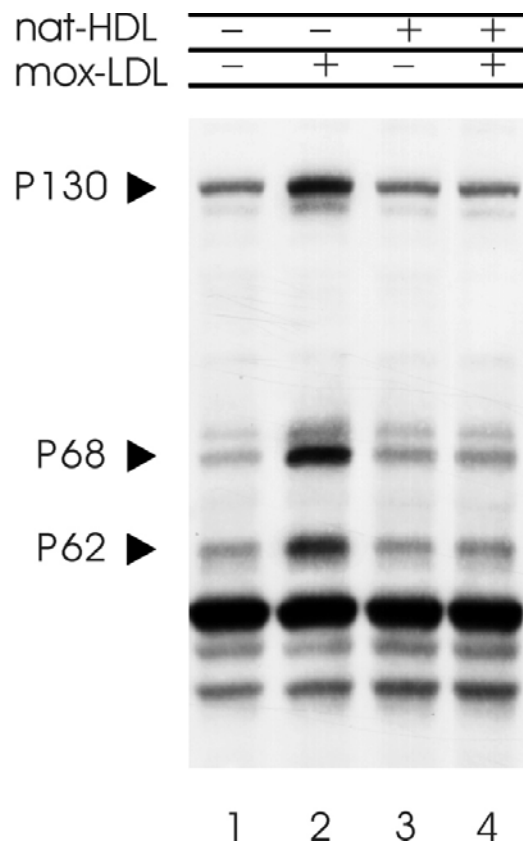
Die morphologischen Untersuchungen an Phasenkontrastmikroskop bestätigen die aggregometrischen Ergebnisse: Unter Anwesenheit nativer Lipoproteine stimulierte Thrombozyten sind deutlich diskoider und haben weniger Pseudopodien ausgebildet, als die kontrollstimulierten Plättchen und sind somit weniger stark aktiviert (nicht bildlich dargestellt).

Untersuchungen zur Proteintyrosinphosphorylierung

Für den Hemmeffekt nativen HDLs auf den *mox*-LDL-induzierten Formwandel wurde auch die Tyrosinphosphorylierung bestimmt: Während in Übereinstimmung mit den fehlenden Eigeneffekten bzgl. der Tz.-Morphologie keine signifikante Änderung der *basalen* Phosphorylierung durch nat-HDL₂ oder nat-HDL₃ zu verzeichnen war (Abnahme der Aliquots nach 15 Sekunden), wurde durch nat-HDL₃ die Stimulation der Tyrosinphosphorylierung von P62, P68 und P130 *nach mox*-LDL komplett gehemmt (Abbildung 14). Analog zu den Ergebnissen zum Formwandel war auch der Effekt auf die Tyrosinphosphorylierung dosisabhängig (Experimente mit [nat-HDL] = 100-500 mg/l).

Abb. 14: Hemmeffekt von nat-HDL₃ auf die *mox*-LDL-induzierte Proteintyrosinphosphorylierung

Die Plättchenstimulation mit *mox*-LDL (0,2 g/l) führt zum Anstieg der detektierbaren Menge phosphorylierter Proteine, darunter P 62, P 68 und P 130 (Bahn 2). Nach vorausgegangener Hemmung durch 500 mg/l nat-HDL₃ ist dieser Effekt deutlich geringer ausgeprägt (Bahn 4). Die Abnahme der Aliquots erfolgte 15 Sekunden nach Zugabe von Dialysepuffer (Bahn 1 zur Kontrolle) oder von nat-HDL₃ (Bahn 3) bzw. am Scheitelpunkt des Gestaltwandels etwa 25 sek. nach Plättchenstimulation mit *mox*-LDL (Bahnen 2 und 4).

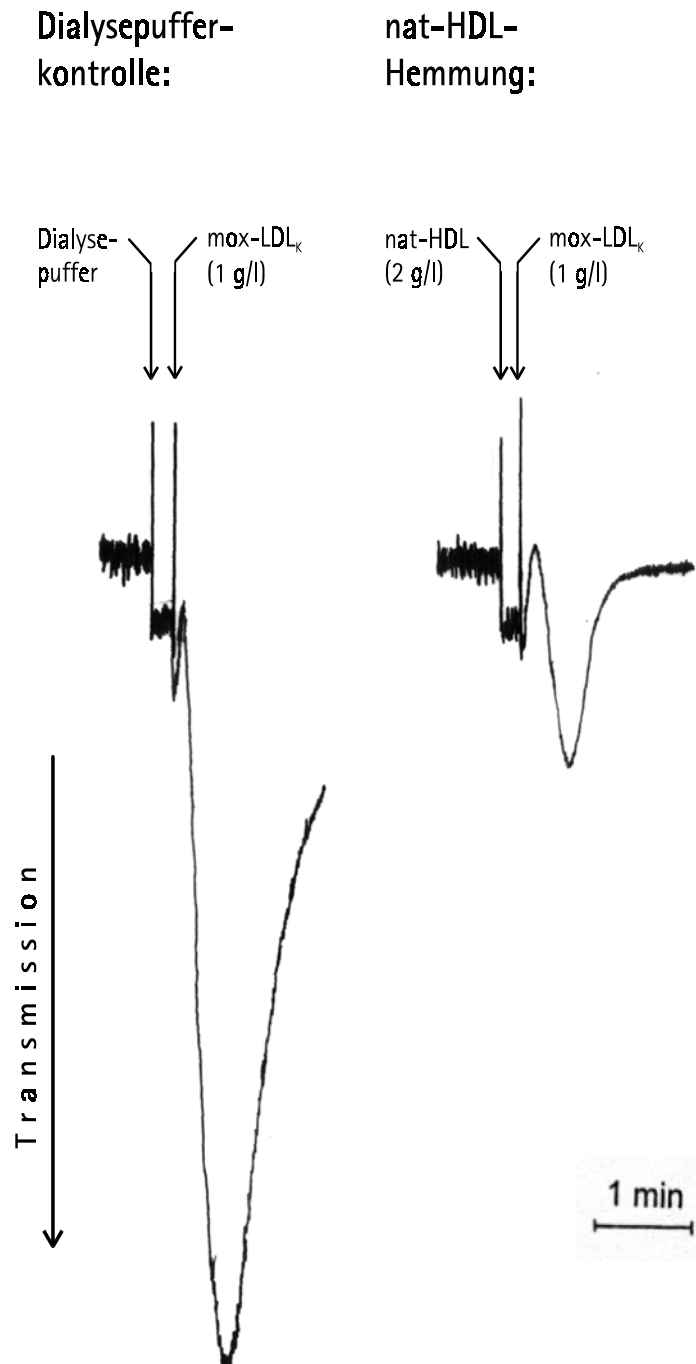


Untersuchungen zur Aggregation

Der Hemmeffekt nativer auf milde oxidierte Lipoproteine ist analog auch bzgl. der Induktion einer Aggregation festzustellen. Am deutlichsten ist er wiederum bei einer mindestens ebenso hohen Konzentration der nativ-hemmenden im Vergleich zur modifiziert-aktivierenden Lipoproteinspezies, d.h. hier insgesamt höheren Dosierungen zwischen 0,5 und 2 g/l.

Abb. 15: Hemmung der *mox*-LDL-induzierten Aggregation durch *nat*-HDL

In der linken Kurve ist die Auslösung einer Aggregation durch *mox*-LDL_x (1g/l), 15 Sekunden nach Zugabe von Dialysepuffer (Kontrolle), dargestellt. Rechts wurde anstelle des Dialysepuffers *nat*-HDL (2g/l) in die Aggregometerküvette pipettiert. Die durch 15 Sekunden später zugegebenes *mox*-LDL_x (1g/l) induzierte Aggregation fällt hier im Vergleich deutlich schwächer aus.



2. Hemmung HDL-assoziierter Enzyme

Überlegungen zur Natur des Hemmeffektes nativen HDLs

Zur weiteren Analyse der Natur des festgestellten Hemmeffektes nativer Lipoproteine, wurden im folgenden die HDL-assozierten Enzyme PAF-Azetylhydrolase (PAF-AH, eine Phospholipase A₂) bzw. Paraoxonase (PON, eine Arylesterase) gehemmt. Dies basierte auf der Vorstellung, daß diese, den Lipidmetabolismus beeinflussenden Enzyme, bestimmte, während der Lipoproteinoxidation entstandene Lipidagonisten rasch abbauen und dadurch den Thrombozyten-aktivierenden Effekt einer mox-Lpp-Gabe abschwächen, weil nur noch ein geringer Teil aktivierender Lipide die Thrombozyten erreicht.

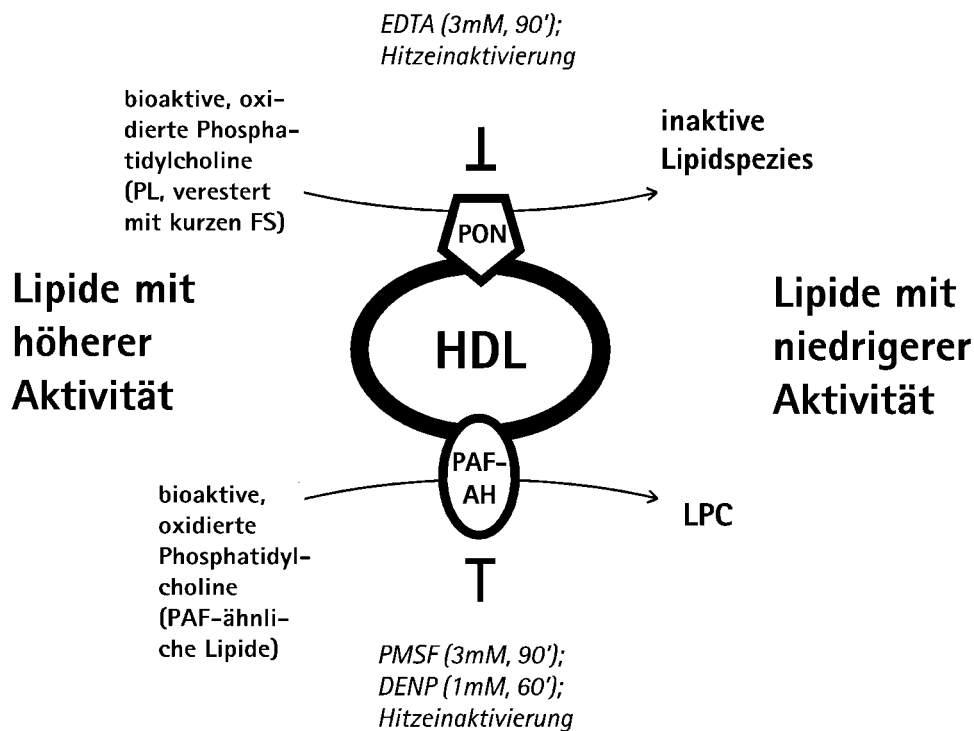


Abb. 16: Arbeitshypothese zur Wirkung der HDL-assozierten Enzyme Paraoxonase (PON) bzw. PAF-Azetylhydrolase (PAF-AH):

Den Versuchen mit Enzymhemmung lag folgende Arbeitshypothese zugrunde:
In milde oxidierten Lipoproteinen befinden sich Phospholipide mit hoher biologischer Aktivität (links dargestellt), welche den thrombozytären Gestaltwandel induzieren. Diese oxidierten Phospholipide werden durch die in nativem HDL enthaltenen Enzyme PON bzw. PAF-AH rasch zu weniger aktiven Lipiden (rechts dargestellt) abgebaut.
In den Experimenten kamen mehrere Alternativmethoden zur Enzyminaktivierung zum Einsatz (oben kursiv gedruckt): Für PON Kalziumentzug durch EDTA, für PAF-AH Inkubationen mit PMSF oder DENP, für die gemeinsame Hemmung die Inkubation bei 56°C.

Die Enzyme selbst würden – so die Vorstellung – während der Oxidation geschädigt (Dentan et al., 1994) und lägen somit in mox-Lpp selbst nicht mehr bzw. nur in weitestgehend inaktiver Form vor. Dieses Modell geht also von einer reinen Lipoprotein-Lipoprotein-Interaktion aus, die Thrombozyten dienen hier lediglich als Detektorsystem. In Abbildung 16 wird die den Enzyminaktivierungen zugrundeliegende Arbeitshypothese skizziert.

Ergebnisse zur Hemmung der Paraoxonase

Es zeigte sich, daß die Inaktivierung der HDL-assoziierten Paraoxonase mittels EDTA *keinen nennenswerten Einfluß* auf den mox-Lpp-induzierten Gestaltwandel hat: Bei Aktivierung via mox-LDL_x ergaben sich für nat-HDL₃ Gestaltwandel von $98\% \pm 26\%$ der PON-inhibierten Proben vs. Kontrolle, für nat-HDL₂ $96\% \pm 15\%$ (MW \pm SA; vier Versuchsdurchgänge). Die zwei mit mox-HDL₃ und nat-HDL₃ durchgeführten Versuche ergaben identische Gestaltwandel der PON-inhibierten Proben vs. Kontrolle. Die Versuche wurden in einem Dosisbereich von 100 mg/l bis 250 mg/l HDL durchgeführt, die Zeit der HDL-Vorinkubation betrug im Mittel 15 sek. *Keine* der Proben wies ein signifikant von den Standard-Hemmversuchen abweichendes Ergebnis auf (daher hier nicht bildlich dargestellt).

Ergebnisse zur Hemmung der PAF-Azetylhydrolase

In unseren Versuchen kamen zwei verschiedene Methoden zur PAF-AH-Inhibition zum Einsatz, die beide als Standardverfahren in der Literatur angeführt werden (Inkubation mit PMSF oder mit DENP = Paraoxon). Als selektivere Methode dürfte wohl die Inkubation mit Paraoxon gelten. Wie wirksam dies unter gleichzeitiger Anwesenheit der PON angesehen werden kann, ist zu diskutieren. Tatsächlich ergaben sich etwas inkonsistente Ergebnisse zwischen beiden Verfahren: Nach Koinkubation von nat-HDL₃ mit PMSF zeigte sich überraschenderweise ein gering reduzierter mox-LDL-induzierter Gestaltwandel von ca. $80\% \pm 25\%$ vs. nat-HDL₃-Kontrolle (nicht signifikant; vier Versuchsdurchgänge). Die Paraoxon-Methode (ohne gleichzeitige PON-Inaktivierung) hingegen zeigte eine Tendenz in der ursprünglich erwarteten Richtung von etwa $135\% \pm 60\%$ des PAF-AH-inhibierten- vs. nativem HDL₃ (allerdings ebensowenig signifikant; drei Versuchsdurchgänge). Der mit mox-HDL₃ und nat-HDL₃ durchgeführte Versuch (PMSF-Methode) ergab identische Gestaltwandel der PAF-AH-inhibierten Proben vs. Kontrolle. Die Versuche wurden in einem Dosisbereich von 50 mg/l bis 500 mg/l HDL durchgeführt, die Zeit der HDL-Vorinkubation betrug im Mittel 15 sek. Erneut *wies keine der Proben ein signifikant von den Standard-Hemmversuchen abweichendes Ergebnis auf* (deshalb nicht bildlich dargestellt).

Gemeinsame Hemmung von Paraoxonase und PAF-Azetylhydrolase

Die zwei folgenden Methoden, die beide Enzyme ausschalten sollten, erbrachten ebenfalls etwas voneinander abweichende Ergebnisse: Die Hitzeinaktivierung bei 56°C wirkt auf die Paraoxonase gering präferentiell. Entsprechende Inkubation des HDL₃ für 10 oder 40 Minuten ergab Gestaltwandel von $82\% \pm 21\%$ nach mox-LDL (enzyminaktiviertes nat-HDL₃ vs. unbehandeltes HDL₃), während die Koinkubation mit EDTA und Paraoxon mit $187\% \pm 75\%$ Formwandel eine nennenswerte Tendenz gemäß der ursprünglichen Hypothese zeigte (jedoch mit $n = 3$ nicht signifikant). Der Dosisbereich deckte 100-500 mg/l (Temperaturmethode) bzw. 125-250 mg/l (Koinkubation).

Bewertung der orientierenden Versuche zu Enzymhemmungen

Zusammenfassend deuten die durchgeführten Enzymhemmungen nicht darauf hin, daß sich der Hemmeffekt nativer Lipoproteine auf den durch milde oxidierte Lipoproteine induzierten Formwandel von Thrombozyten durch spezifische, enzymatisch bedingte Lipoproteininteraktionen zurückführen ließe. Insbesondere spielt der potentiell denkbare Abbau PAF-ähnlicher Lipide, wie für längerfristige mm-LDL-Effekte von der Gruppe um A. D. Watson und A. M. Fogelman vorgeschlagen (Watson et al., 1997), für unsere Fragestellung an rasch vonstatten gehenden Reaktionen offensichtlich keine Rolle.

III. Charakterisierung der mox-Lpp-induzierten Thrombozytenaktivierung auf Rezeptorebene: Desensibilisierungsassay und Rezeptorantagonisten

1. Entwicklung eines Desensibilisierungsassays gewaschener Plättchen

Untersuchungen zur homologen Desensibilisierung gewaschener Plättchen durch mox-LDL

Für viele physiologische Thrombozytenstimuli ist das Phänomen der homologen Desensibilisierung bekannt. Interessanterweise wurde dies auch für die Wirkung von mox-LDL gefunden (Abbildung 18a, S. 71): Durch die einmalige Gabe von mox-LDL_x (im Beispiel die

übliche Dosis von 200 mg/l) wird in typischer Weise ein Gestaltwandel hervorgerufen. Wartet man nun, bis diese Aktivierung abgeklungen ist (im Beispiel der übliche Zeitraum von 5 min.), so läßt sich durch eine weitere mox-LDL-Gabe identischer Stoffmenge kein erneuter Gestaltwandel hervorrufen: Die Thrombozyten sind desensibilisiert. Dieser Vorgang ist hochselektiv: Die darauffolgende Gabe eines anderen Agonisten (d.h. eines Agonisten, der einen anderen thrombozytären G-Protein gekoppelten Rezeptor stimuliert) bewirkt eine ganz normale, im Vergleich zur Kontrolle unbeeinflusste und unveränderte Thrombozytenaktivierung (im Beispiel ADP und YFLLRNP). Die mikroskopischen Untersuchungen untermauern die Tatsache, daß es sich um eine Desensibilisierung handelt. In Zeitverläufen läßt sich die Rückkehr zur diskoiden Form einige Minuten nach der Stimulation durch mox-LDL beobachten; die zweite mox-LDL-Gabe führt dann zu keiner erneuten Reaktion (nicht bildlich dargestellt). Auch die Bestimmung der Proteintyrosinphosphorylierung zeigt eine homologe Desensibilisierung: Fünf Minuten nach einer ersten Stimulation ist die Phosphorylierung der Proteine P62, P68 und P130 wieder auf das jeweilige basale Niveau abgefallen. Die erneute mox-LDL-Gabe führt zu keiner zweiten Zunahme der Phosphorylierung (siehe Abbildung 19b, S. 74).

Gegenüberstellung von Desensibilisierung und Hemmeffekt

Im folgenden sind die in Kap. II beschriebenen Hemmeffekte durch native Lipoproteine und das jetzt dargestellte Phänomen der Desensibilisierung auseinanderzuhalten. Die unterschiedlichen wirksamen Dosisbereiche geben den ersten Hinweis zur Differenzierung: Für eine *komplette* Hemmung des Effekts von 200 mg/l mox-LDL wären mindestens 1000 mg/l nat-Lpp vonnöten. Eine komplette Desensibilisierung zeigt sich bereits bei einer identischer Mengenvorgabe von 200 mg/l. Außerdem ist die Hemmung nach Desensibilisierung zeitabhängig: Die minimale Aktivierbarkeit der Thrombozyten findet sich hier unmittelbar nach dem Abklingen des durch die Erststimulation induzierten Gestaltwandels. Hingegen ist der Hemmeffekt durch native Lipoproteine praktisch unabhängig davon, welcher Zeitraum bis zur Zugabe von mox-LDL bzw. mox-HDL verstreicht. Eine exemplarische Gegenüberstellung zeigt Abbildung 18c.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Hemmeffekten kann die Desensibilisierung je nach Thrombozytenspender individuell unterschiedlich stark ausgeprägt sein: Meist läßt sich durch die zweite, eigentlich überschwellige (≥ 100 mg/l) Gabe einer der Erstgabe entsprechenden Stoffmenge überhaupt keine Thrombozytenaktivierung auslösen. Vereinzelt findet sich nur eine Reduktion der Zweitantwort auf bis zu 50% der Erstantwort; um auch hier eine komplette Refraktion zu erreichen, muß entweder die Dosis der beiden Stimulationen weiter erhöht werden

(≥ 200 –250 mg/l) oder mehrere Vorstimulationen mit einer relativ niedrigeren Dosis (z. B. 2–3 mal 100 mg/l in jw. fünfminütigen Abständen) erfolgen. Tabelle 10 gibt repräsentative Ergebnisse eines Versuchsdurchgangs wieder.

Tab. 10: Höhere Dosen mox-Lpp führen gewöhnlich zur kompletten Desensibilisierung

1. Stimulus mox-LDL	Gw. in cm	2. Stimulus mox-LDL nach 5 min.	Gw. in cm	ggf. 3. Stimulus mox-LDL nach weiteren 5 min.	Gw. in cm	abschließende ADP-Kontrolle, Gw. in cm
20 mg/l	3,8	20 mg/l	3,8	–	–	–
50 mg/l	7,5	50 mg/l	3,3	50 mg/l	0,7	8,2
200 mg/l	10,0	200 mg/l	0,0	–	–	8,8

Innerhalb eines Versuches wurde das Ausmaß der Desensibilisierung fünf Minuten nach einer mox-LDL-Gabe registriert. Wie in den meisten Fällen ließ sich über 100 mg/l bereits eine komplette Desensibilisierung gegenüber einer zweiten Gabe feststellen, während sie bei niedrigeren Dosierungen noch inkomplett ist. Wiederholte Gaben innerhalb eines gewissen Dosisbereichs, im dargestellten Fall 50 mg/l, können den Effekt ebenfalls verstärken. Der Gw. durch ADP als anschließende Kontrolle ist auch dann nicht verändert.

Verwendung der Desensibilisierung als Assay

Der selektive Charakter der Desensibilisierung eröffnet dem Untersucher nun die Möglichkeit, auch ohne genaue Kenntnis der an der mox-LDL-Wirkung beteiligten thrombozytären Rezeptorstrukturen systematisch nach dem darin wirksamen Prinzip zu suchen: Via mox-LDL desensibilisierte Thrombozyten müssen sich gegenüber all den (und nur den) Agonisten refraktär zeigen, die dieselbe Wirksubstanz enthalten oder zumindest ihre Wirksamkeit über denselben Rezeptor entfalten. Außerdem muß die Desensibilisierung dann auch in der umgekehrten Reihenfolge erfolgen können.

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf ein Lipid oder Lipidderivat als Träger der biologischen Wirksamkeit: Dafür spricht, (1) daß HDL durch die milde Oxidation ebenso an biologischer Aktivität gewinnt wie LDL (trotz anderer Proteinbestandteile) und (2) der Gewinn biologischer Aktivität weitgehend unabhängig von der Art des Modifikationsverfahrens (trotz Unterschiede bei der von Proteinveränderungen abhängigen elektrophoretischen Mobilität, beispielsweise zwischen mox- und ox_r-LDL).

Gegenseitige Desensibilisierung von mox-LDL und mox-HDL

Zuerst konnte mittels dieses Desensibilisierungsassays belegt werden, daß mox-LDL und mox-HDL dasselbe Wirkprinzip besitzen: Eine bestimmte Menge des einen milde oxidierten

Lipoproteins desensibilisierte die Thrombozyten für die identische Menge des jeweils anderen (Abbildung 18b). Auch die einzelnen HDL-Subgruppen mox-HDL₂ und mox-HDL₃ erwiesen sich als gleichwertig und austauschbar. In Tabelle 11 sind die Desensibilisierungsversuche mit verschiedenen oxidierten Lipoproteinen zusammengestellt: Sowohl LDL bzw. HDL, als auch milde oxidierte (mox-Lpp) bzw. minimal modifizierte (mm-Lpp) Lipoproteine desensibilisieren Thrombozyten untereinander, d.h. der zweite Agonist ruft keinen nennenswerten Formwandel mehr hervor. Die Thrombozytenantwort auf stärker oxidierte LDL-Spezies läßt sich hingegen nicht völlig desensibilisieren; insbesondere ox₅-LDL zeigt nur einen geringen Desensibilisierungseffekt.

Tab. 11: Desensibilisierung der Plättchenantwort durch zweimalige Gabe von Lipoproteinsuspensionen

1. Agonist	2. Agonist	n	Gw. in cm (min.-max.) 2. Agonist	Gw. in cm (MW ± SA) 2. Agonist	Gw. in % des <i>nicht</i> desensibili- sierten Stimulus
1. mox-LDL (63-500 mg/l)	mox-LDL (63-500 mg/l)	12	0,0-0,4	0,0 ± 0,1	0,6 ± 1,9
2. mox-HDL _{2/3} (125-500 mg/l)	mox-HDL _{2/3} (125-500 mg/l)	7	0,0-1,1	0,3 ± 0,5	5,2 ± 9,9
3. mox-LDL (63-500 mg/l)	mox-HDL ₃ (63-500 mg/l)	4	0,0-0,6	0,1 ± 0,3	2,9 ± 5,8
4. mox-HDL ₃ (63-500 mg/l)	mox-LDL (63-500 mg/l)	5	0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
5. mm-LDL (125 mg/l)	mox-HDL ₃ (125 mg/l)	1	0,0	0,0	0,0
6. SIN-LDL (300-500 mg/l)	SIN-LDL (300-500 mg/l)	2	1,0-2,0	1,5 ± 0,7	33,6 ± 16,8
7. mox-LDL (200 mg/l)	ox ₁ -LDL (100 mg/l)	1	0,8	0,8	8,3
8. ox ₅ -LDL (100 mg/l)	ox ₅ -LDL (100 mg/l)	2	3,9-4,0	3,9 ± 0,1	79,9 ± 12,7

Desensibilisierung zwischen verschiedenen oxidierten Lipoproteinen. Aufgeführt ist der thrombozytäre Gestaltwandel (Gw.) nach Zugabe des zweiten Agonisten als Absolutwert in cm bzw. im Verhältnis zur undesensibilisierten Plättchenantwort.

Zum Vergleich die Absolutwerte undesensibilisiert: mox-LDL: 1,8-10,4 cm/6,7 ± 2,6 cm; mox-HDL_{2/3}: 1,5-12,0 cm/5,1 ± 2,7 cm; SIN-LDL: 2,0-4,6 cm/3,4 ± 1,2 cm; ox₁-LDL: 2,3-6,0 cm/4,1 ± 2,6 cm; ox₅-LDL: 4,5-5,5 cm/4,8 ± 0,6 cm.

2. Kreuzdesensibilisierung zwischen modifizierten Lipoproteinen und Lysophosphatidsäure

Milde oxidierte Lipoproteine und Lysophosphatidsäure

Mit Hilfe des Desensibilisierungsassays wurden systematisch als Wirksubstanz in Frage kommende Lipidmoleküle getestet. Einige Verbindungen wie Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und via den PAF-Rezeptor agierende Derivate, konnten bereits in früheren Untersuchungen ausgeschlossen werden (Weidtmann et al., 1995). Die Unbeeinflussbarkeit des oxidationsbedingten Aktivitätsanstiegs durch die verschiedenen Enzymhemmungen sprach ebenfalls gegen PAF-ähnliche Lipide, etwa 1-Palmitoyl-2-(5-Oxovaleryl)-sn-Glycero-3-Phosphocholin und 1-Palmitoyl-2-Glutaryl-sn-Glycero-3-Phosphocholin, wie sie von Watson et al. (1997) als Träger der biologischen Aktivität von mm-LDL auf Endothelzellen gefunden worden waren. Erwartungsgemäß fand sich keine Kreuzdesensibilisierbarkeit zwischen PAF und mox-Lpp. Lysophosphatidylcholin (LPC) als häufigstes der einfacheren Lipide zeigte bei höheren Konzentrationen lytische Wirkung auf die Plättchen. Allerdings steigt der LPC-Gehalt von LDL während der milden Oxidation an (C. Corrinth, unveröffentlichte Daten).

Das Fehlen einer Kreuzdesensibilisierbarkeit zu mox-Lpp widerlegte nun eine größere Rolle von LPC als Wirksubstanz (Abbildung 17).

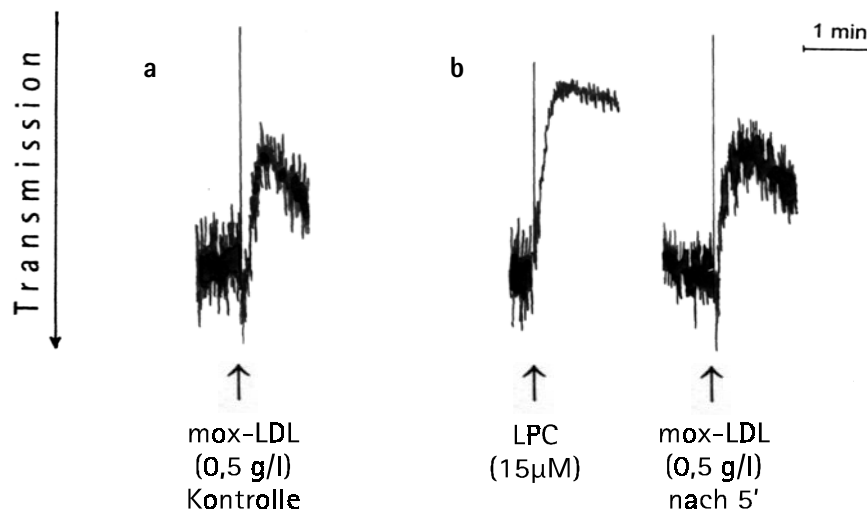
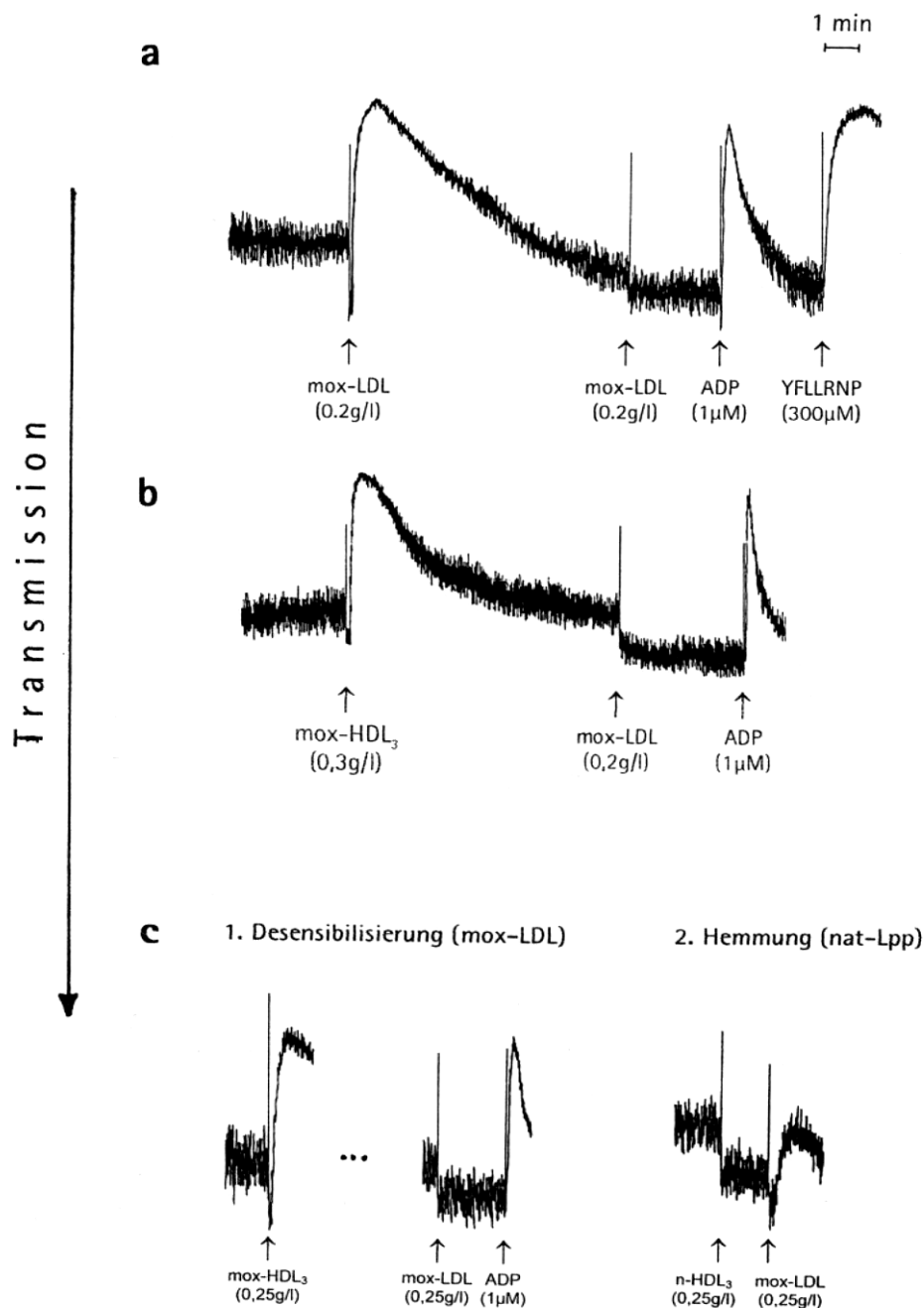


Abb. 17: Keine Desensibilisierung des mox-LDL-induzierten thrombozytären Formwandels durch Lysophosphatidylcholin (LPC)

Links ist der thrombozytäre Formwandel, induziert durch 500 mg/l mox-LDL dargestellt (Kontrolle, Probe a). Die mittlere Kurve gibt den Gw. einer anderen Probe (b) nach Gabe von 15 µM LPC wieder, welcher nach 5 Minuten abgeklungen ist. Stimuliert man nun diese zweite Probe mit 500 mg/l mox-LDL, zeigen sich keine Unterschiede zur Kontrolle.

Anders lagen die Verhältnisse bei den Versuchen mit *Lysophosphatidsäure (LPA)*: Nach der Gabe einer hinreichenden Menge Oleoyl- oder Palmitoyl-LPA (200 nM bis 1 μ M) war mit mox-LDL (200 mg/l) kein weiterer Gestaltwandel mehr auslösbar (Abbildung 18d). Ebenso konnte die durch mox-HDL₂ oder mox-HDL₃ induzierte Plättchenantwort mit LPA desensibilisiert werden (Abbildung 18e). Die durch andere physiologische Thrombozytenstimuli induzierten Formwandel hingegen blieben unbeeinflusst (im Beispiel ADP und YFLLRNP, aber auch nach Lipidagonisten wie PAF oder LPC).



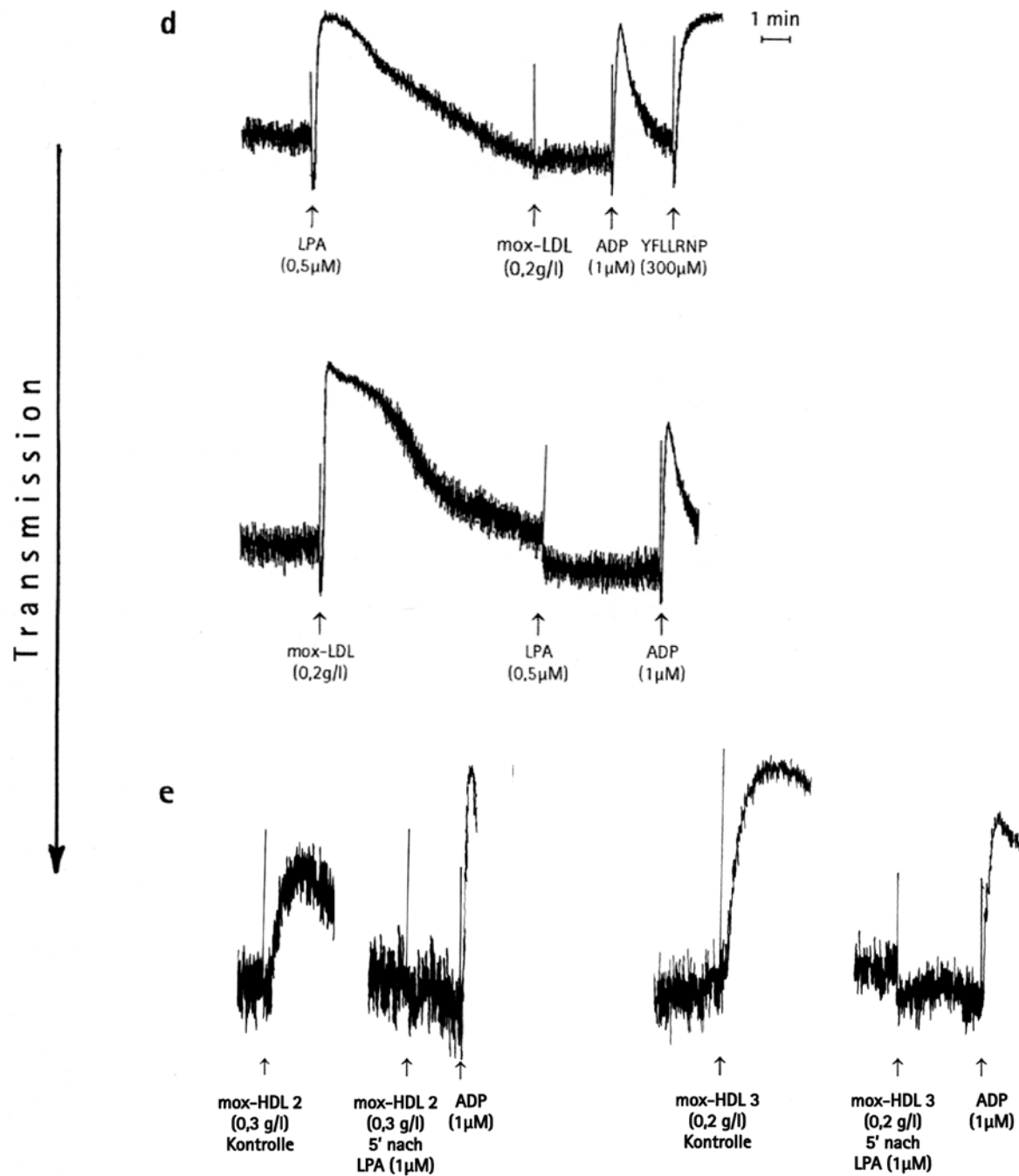


Abb. 18: Phänomen der Desensibilisierung (Aggregometermessungen, Gestaltwandel)

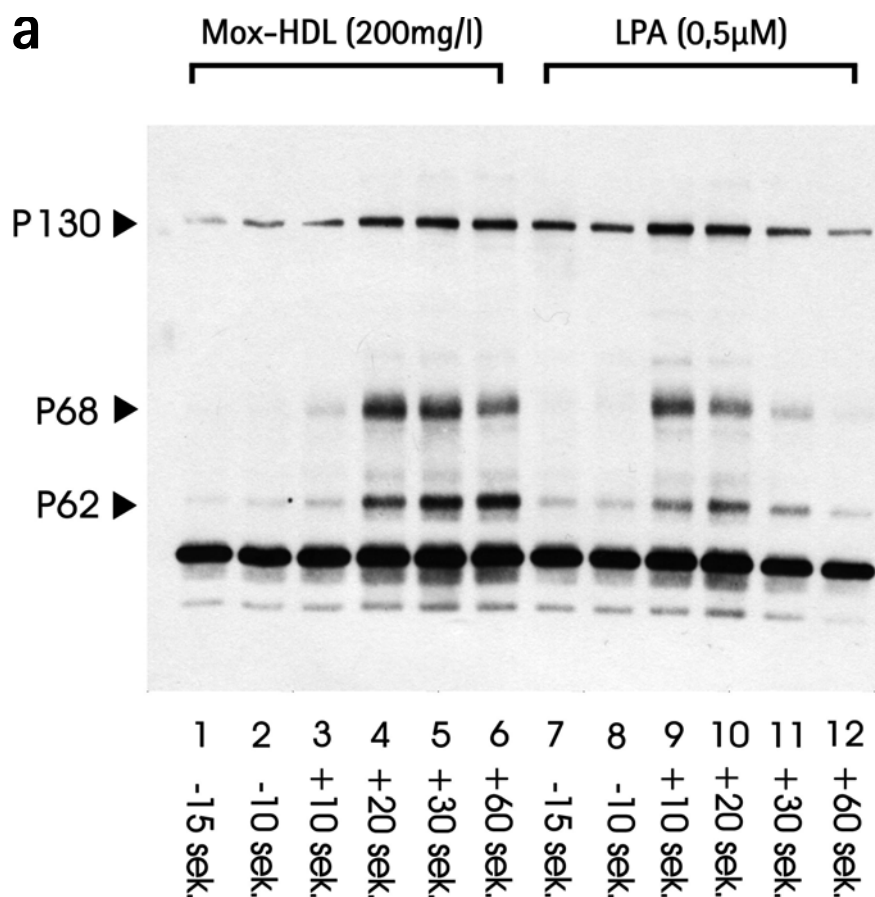
- a) Homologe Desensibilisierung mit mox-LDL_K
b) Kreuzdesensibilisierung zwischen mox-HDL₃ und mox-LDL_K
c) Gegenüberstellung von Desensibilisierung und nat-Lpp-vermitteltem Hemmeffekt
d) Kreuzdesensibilisierung zwischen LPA und mox-LDL_K
e) Kreuzdesensibilisierung zwischen LPA und mox-HDL₂, LPA und mox-HDL₃
Hier ist jw. links die undesensibilisierte Kontrolle des oxidierten Lipoproteins dargestellt und rechts daneben die Plättchenantwort fünf Minuten nach LPA-Gabe. (Mox-HDL₂ und mox-HDL₃ stammen aus verschiedenen Lipoproteinpräparationen.)

Auch in umgekehrter Reihenfolge zeigten sich die Thrombozyten durch mox-Lpp für eine nachfolgende LPA-Gabe desensibilisierbar: In Abbildung 18d ist ein Beispiel wiedergegeben, wo 5 min. nach Gabe von 200 mg/l mox-LDL kein Formwandel durch 500nM LPA induziert werden kann. Hier mag es zwar zu einer Überlagerung von Lipoprotein-bedingtem Hemmeffekt und Desensibilisierung kommen (denn das LDL verbleibt ja in der Küvette), doch durch den Hemmeffekt von 200 mg/l LDL alleine käme es lediglich zu einer Reduktion des LPA-induzierten Gestaltwandels anstelle des abgebildeten völligen Ausbleibens der Plättchenreaktion (Gegenüberstellung von Desensibilisierung und Hemmeffekt: Abbildung 18c).

Mox-Lpp induzieren den thrombozytären Gestaltwandel also über dieselbe Signalkaskade bzw. den-/dieselben Rezeptor(en) wie LPA.

Zwischen Aktivität und Verhalten von Oleoyl- und Palmitoyl-LPA fanden sich in unserem Versuchsaufbau keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise nahm die Lichttransmission am Aggregometer bei submaximalen Dosen reiner LPA durchschnittlich etwas rascher ab, als bei den komplex strukturierten mox-Lpp. Dies könnte beispielsweise als die Zeit gedeutet werden, die am Lipoproteinpartikel gebundene LPA zur Ablösung (und Diffusion) an den thrombozytären Rezeptor benötigt.

Morphologie und Proteintyrosinphosphorylierung



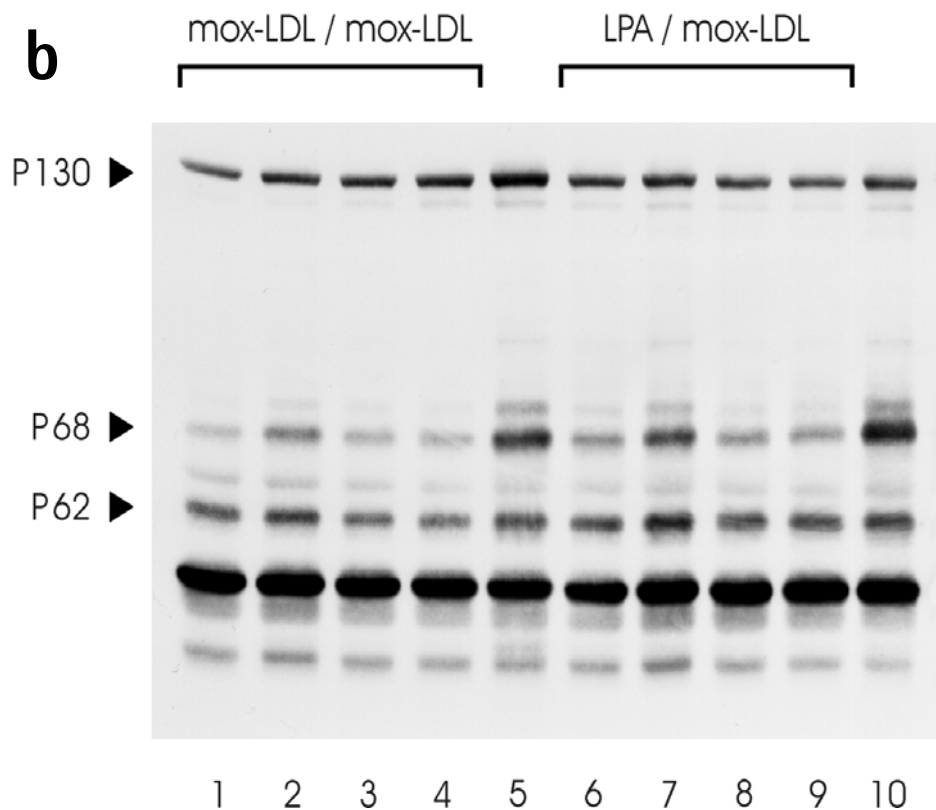


Abb. 19: Proteintyrosinphosphorylierung induziert durch mox-HDL, mox-LDL und LPA:
Kinetik und Desensibilisierung

- a) Die Abbildung gibt die Kinetik der Tyrosinphosphorylierung nach einem mox-HDL₃- bzw. LPA-Stimulus wieder. Auf den Bahnen 1-6 wurden die Aliquots nach Stimulation mit mox-HDL₃ (200 mg/l) aufgetragen, auf den Bahnen 7-12 nach LPA (0,5 µM). Die jeweils ersten beiden Bahnen geben Kontrollwerte wieder (Bahnen 1 und 7: 15 sek. vor Agonistenexposition; Bahnen 2 und 8: 10 sek. vorher). Auf den anderen Bahnen wurden Aliquots nach Stimulation aufgetragen (Bahnen 3 und 9: 10 sek. nachher; 4 und 10: 20 sek.; 5 und 11: 30 sek.; 6 und 12: 1 min. nach Stimulation).
- b) Die Abbildung gibt die Tyrosinphosphorylierung im Verlauf einer homologen Desensibilisierung (mox-LDL/mox-LDL, Bahnen 1-5) und einer Kreuzdesensibilisierung (LPA/mox-LDL, Bahnen 6-10) wieder.
- Innerhalb einer Küvette abgenommene Aliquots einer homologen Desensibilisierung:
 Bahn 1: Leerwert, Bahn 2: 200 mg/l mox-LDL, Bahn 3: abgeklungene Phosphorylierung 5 min. nach erstem mox-LDL-Stimulus, Bahn 4: erneute Gabe von 200 mg/l mox-LDL (Aliquotierung zum Zeitpunkt maximaler Transmissionsabnahme, ca. 25 sek.), Bahn 5: nachfolgende ADP-Positivkontrolle.
- Innerhalb einer Küvette abgenommene Aliquots einer Kreuzdesensibilisierung:
 Bahn 6: Leerwert, Bahn 7: 1 µM LPA (maximale Transmissionsabnahme, ca. 20 sek.), Bahn 8: abgeklungene Phosphorylierung 5 min. nach LPA-Stimulus, Bahn 9: 200 mg/l mox-LDL, Bahn 10: nachfolgende ADP-Positivkontrolle.

Die Studien am Phasenkontrast- und Rasterelektronenmikroskop bestätigen die Aggregometerergebnisse (siehe Abbildung 10, S. 52): Die durch mox-LDL, mox-HDL und LPA aktivierten Thrombozyten waren bei geeigneter Dosiswahl morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden; eine mox-LDL-induzierte Abkugelung und Pseudopodienbildung war durch eine vorherige LPA-Gabe im Sinne der Desensibilisierung zuverlässig zu verhindern (und *vice versa*).

Auch die Analyse der Proteintyrosinphosphorylierung fügt sich in die übrigen Ergebnisse ein: Mit LPA desensibilisierte Thrombozyten, bei denen die Tyrosinphosphorylierung nach 5 min wieder auf Kontrollniveau abgeklungen war, reagierten mit keinem neuerlichen Anstieg derselben auf einen mox-Lpp-Stimulus – im Gegensatz zur Gabe von Kontrollagonisten (im Beispiel ADP; Abbildung 19b). So wie sich die Aggregometerkurven bei LPA- und mox-Lpp-Stimulation ähneln, sind auch die Kinetiken der Tyrosinphosphorylierung vergleichbar, wobei der gesamte Ablauf bei einer Stimulation mit LPA (0,5 μ M) fast doppelt so schnell vonstatten geht, wie bei mox-HDL₃ (200 mg/l; Abbildung 19a).

Abgrenzung gegenüber LPA-ähnlichen Lipiden

Eine für unsere Fragestellung weitergehende Bedeutung von LPC, PAF und via den PAF-Rezeptor signalisierenden, strukturell verwandten Lipiden, konnte, wie erwähnt, bereits im Vorfeld ausgeschlossen werden. Dasselbe gilt für die große Gruppe der Phosphatidylcholine (PC).

Phosphatidsäure (PA) in der uns zur Verfügung stehenden Aufbereitung zeigte scheinbar einen LPA-identischen Effekt in etwa 10- bis 20-fach höheren Konzentrationen. Eine orientierende analytische Chromatographie offenbarte jedoch eine ca. 5- bis 10-prozentige LPA-Verunreinigung der PA-Probe; die eluierte, nun reine PA zeigte keine Thrombozyten-aktivierende Wirkung mehr, so daß auch sie aus der weiteren Betrachtung ausgeschlossen werden konnte.

Für *Sphingosin-1-Phosphat (S-1-P)* ergaben unsere Untersuchungen um mindestens zwei Zehnerpotenzen niedrigere Aktivitäten als für Palmitoyl-LPA: S-1-P zeigte sich wirksam ab ca. 20 μ M gegenüber LPA ab ca. 50 nM; innerhalb eines Versuches konnte mit 20 μ M S-1-P ein Formwandel wie mit 100nM LPA oder 100mg/l mox-LDL induziert werden. Damit ergaben sich auch gewisse Probleme, S-1-P in den erforderlichen Konzentrationen hinreichend in Lösung zu halten, ohne finale Ethanolkonzentrationen von 0,5% zu überschreiten, welche Artefakte (unspezifische Eigenaktivität) ergeben hätten. Für Konzentrationen \geq 20 μ M wurde S-1-P daher an delipidiertes BSA gebunden oder in natives (inaktives) HDL₃ inkorporiert.

In der Reihenfolge LPA \rightarrow S-1-P auch konnten komplette Desensibilisierungen nachgewiesen werden. Aufgrund des untersuchten, begrenzten Dosisbereiches für S-1-P wurde in der

Reihenfolge S-1-P → LPA hingegen nur eine Reduktion und keine vollständige Hemmung des LPA-induzierten Formwandels festgestellt. Dies dürfte methodisch bedingt sein und prinzipiell eine Kreuzdesensibilisierbarkeit zwischen beiden Agonisten vorliegen, allerdings mit weit höherer EC_{50} für S-1-P als für LPA.

Ausdehnung auf andere Formen der Lipoproteinmodifikation

Das für milde oxidierte Lipoproteinspezies Gesagte läßt sich weitestgehend auf in anderer Weise gering modifizierte Lipoproteine ausdehnen. Mm-LDL und mm-HDL₃ verhielten sich analog zu mox-LDL und mox-HDL₃. Desensibilisierungen ließen sich in jeder Kombination durchführen, wobei die Experimente nur mit bioaktiven mm-Lpp-Spezies durchgeführt wurden, damit sich die lipoproteineigenen Hemmeffekte nicht mit der eigentlichen Desensibilisierung überlagerten. Dieser Punkt stellte auch das Problem bei den SIN-LDL- und insbesondere SIN-HDL-Untersuchungen dar, welche oftmals eine eher geringe Aktivität aufwiesen. Nach LPA-Erstgabe konnte jedenfalls eine deutliche Reduktion des SIN-LDL-induzierten Gestaltwandels festgestellt werden, was die Übertragbarkeit der bisherigen Überlegungen auch auf SIN-1-modifizierte Lipoproteine nahelegt. Nach SIN-Gaben war allerdings auch der Formwandel durch nachfolgende andere physiologische Agonisten, etwa ADP gehemmt, was durch die direkte Wirkung von SIN-1 auf die Thrombozyten erklärt wird.

Auch die Plättchenreaktion durch Gabe von stärker oxidiertem ox_T-LDL oder ox_T-HDL₃ fiel nach vorangegangener LPA-Stimulation aus, während sich für das noch stärker oxidierte ox_S-LDL keine vollständige Desensibilisierung mehr nachweisen ließ (Abbildung 20, übernächste Seite). Dabei könnte die Restreaktion durch hier in relevanten Mengen zusätzlich gebildete weitere Agonisten (z.B. LPC) erklärt werden, die ihre Stimulation nicht über einen so deutlich desensibilisierbaren Signalweg vermitteln. Die Signifikanz dieses Ergebnisses ist allerdings eingeschränkt (nur zwei ox_T- und eine ox_S-Präparation). Tabelle 12 stellt die Desensibilisierungsergebnisse der einzelnen Lipoproteine gegenüber. (Vgl. zudem Tabelle 11, S. 69.)

Tab. 12: Desensibilisierbarkeit der Plättchenantwort auf modifizierte Lipoproteine und LPA

a Kreuzdesensibilisierung zwischen Lipoproteinsuspensionen und LPA

1. Agonist	2. Agonist	n	Gw. in cm (min.-max.) 2. Agonist	Gw. in cm (MW \pm SA) 2. Agonist	Gw. in % des <i>nicht</i> desensibil. Stimulus
1. LPA _{Ol/Pal} (0,2–1 μ M)	LPA _{Ol/Pal} (0,2–1 μ M)	8	0,0–5,8	1,7 \pm 2,2	21,6 \pm 27,0
2. LPA (50nM–5 μ M)	mox-LDL (200–500 mg/l)	21	0,0–5,7 ¹	1,1 \pm 1,8	14,1 \pm 22,4
3. LPA (0,2–1 μ M)	mox-HDL (200–500 mg/l)	6	0,0–4,9	1,8 \pm 2,2	21,0 \pm 21,9
4. mox-LDL (200 mg/l)	LPA (1 μ M)	2	1,4–3,0	2,2 \pm 1,1	22,7 \pm 5,7
5. mox-HDL (200 mg/l)	LPA (1 μ M)	2	1,0–2,7	1,8 \pm 1,2	26,7 \pm 13,0
6. LPA (50nM–1 μ M)	SIN-LDL (200–500 mg/l)	6	0,0–2,6	1,2 \pm 1,2	38,2 \pm 41,7
7. LPA (0,5–1 μ M)	ox _r -LDL (25–50 mg/l)	2	0,0	0,0	0,0
8. LPA (1 μ M)	ox _s -LDL (100 mg/l)	1	2,5	2,5	56,8

b Abgrenzung gegenüber LPA-ähnlichen Lipiden

1. Agonist	2. Agonist	n	Gw. in cm (min.-max.) 2. Agonist	Gw. in cm (MW \pm SA) 2. Agonist	Gw. in % des <i>nicht</i> desensibil. Stimulus
1. LPA (1 μ M)	LPC (30 μ M)	1	3,8	3,8	92,7
2. LPC (30 μ M)	LPA (1 μ M)	1	– ²	–	–
3. LPC (15–30 μ M)	LPC (15–30 μ M)	2	2,9–3,3	3,1 \pm 0,3	73 \pm 17
4. LPA (1 μ M)	PAF (1 μ M)	1	> 9,2	> 9,2	–
5. LPC (15 μ M)	mox-LDL (500 mg/l)	1	3,9	3,9	92,9
6. mox-LDL (500 mg/l)	LPC (15 μ M)	1	1,3 ³	1,3	31,0

Aufgeführt ist der thrombozytäre Gestaltwandel (Gw.) nach Zugabe des zweiten Agonisten als Absolutwert in cm bzw. im Verhältnis zur undesensibilisierten Plättchenantwort.

Zum Vergleich die Absolutwerte undesensibilisiert: LPA: 3,8–11,2 cm/7,7 \pm 2,4 cm; mox-LDL: 1,8–10,4 cm/6,7 \pm 2,6 cm; mox-HDL_{2/3}: 1,5–12,0 cm/5,1 \pm 2,7 cm; SIN-LDL: 2,0–4,6 cm/3,4 \pm 1,2 cm; ox_r-LDL: 2,3–6,0 cm/4,1 \pm 2,6 cm; ox_s-LDL: 4,4 cm.

(1) In 16 von 21 Versuchen komplette Desensibilisierung auf 0,0 cm.

(2) Gw. nach 30 μ M LPC nicht reversibel, daher hier keine sinnvollen Angaben möglich.

(3) Hierbei ist auch der grundsätzliche Hemmeffekt von Lipoproteinen (nat und mox) zu beachten.

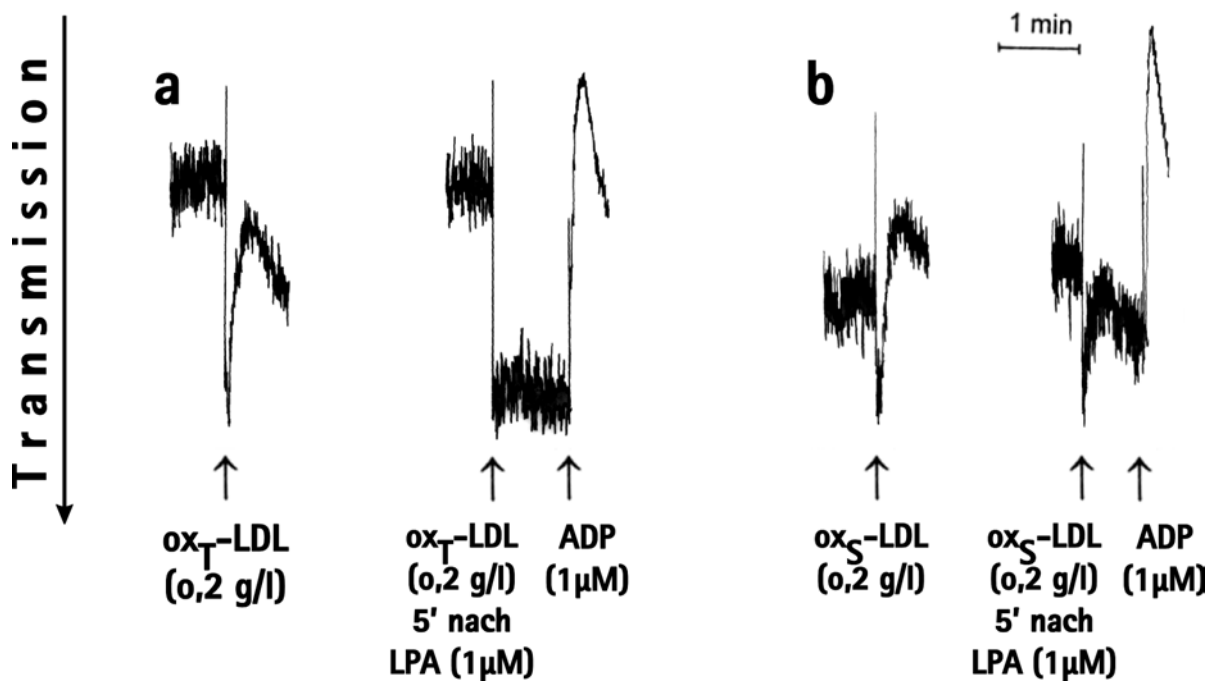


Abb. 20: Desensibilisierung bei ox-LDL (Aggregometermessungen, Gestaltwandel)

- a) Kreuzdesensibilisierung zwischen LPA und nach Takahashi oxidiertem ox_T -LDL. Links ist die undesensibilisierte Kontrolle dargestellt, rechts das Ausbleiben des ox_T -LDL-induzierten Formwandels der Plättchen fünf Minuten nach ihrer Desensibilisierung durch $1\mu M$ LPA.
- b) Teilweise Kreuzdesensibilisierung zwischen LPA und stark oxidiertem ox_S -LDL. Der thrombozytäre Formwandel fünf Minuten nach LPA-Gabe ist nur vermindert.

Untersuchungen zur Aggregation

Die Aggregometerkurven ähneln sich für LPA und mox-LDL stark innerhalb einer Präparation. Auch variiert die Sensitivität der Plättchen jw. für beide gemeinsam; es fand sich also beispielsweise *keine* Tz.-Suspension wo mit LPA erst hochdosiert eine Aggregation ausgelöst werden konnte, aber bereits niedrigdosiert mit mox-LDL. Die Sensitivität gegenüber anderen Agonisten (z.B. Adrenalin) war hiervon unabhängig.

Mox-LDL- oder LPA-induzierte Aggregationen konnten in identischer Weise durch vorherige Gabe einer der beiden Substanzen unterbunden werden, wie dies für den Gestaltwandel festgestellt worden war. Da es nicht angemessen erschien, Thrombozyten wiederholt reversiblen Aggregationen zu unterwerfen, erfolgte die erste Gabe des Agonisten in unterschwelliger, d.h. selbst nicht aggregationsauslösender Dosis; auch wurden PPP und – soweit nötig – ADP erst vor der zweiten Agonistenexposition zugegeben. Ein Beispiel gibt Abbildung 21 wieder.

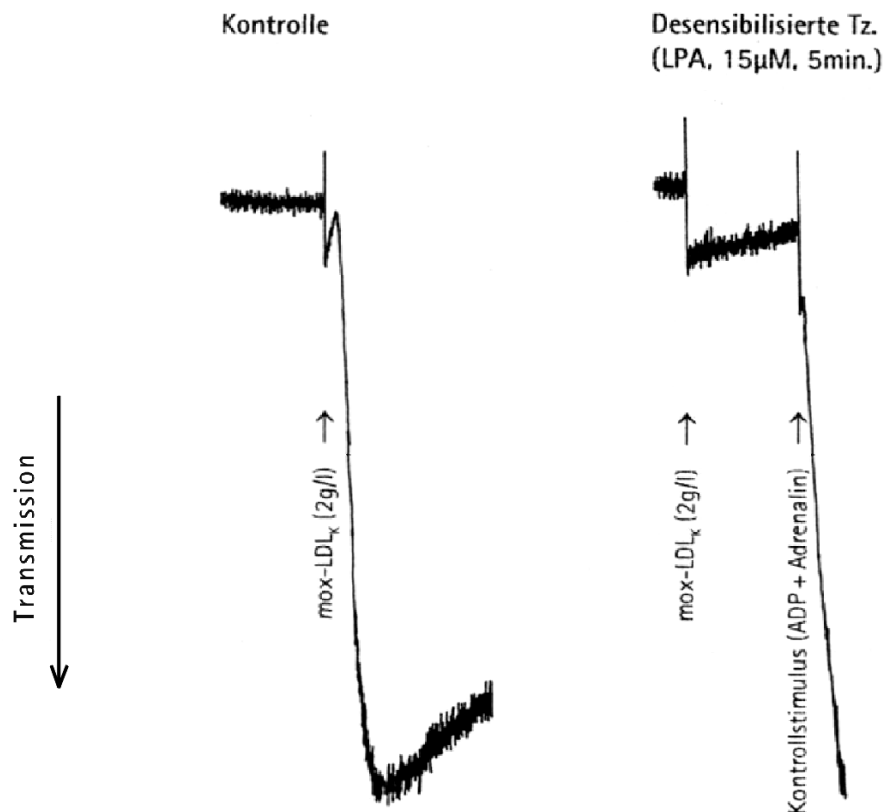


Abb. 21: Phänomen der Desensibilisierung (Aggregometermessungen, Aggregation)

Links ist die Aggregation nach Gabe von 2 g/l max-LDL_K dargestellt. Die rechte Kurve zeigt das Ausbleiben dieser Aggregation fünf Minuten nach Desensibilisierung mit 15µM LPA. Versuche unter Anwesenheit von 2% PPP.

3. LPA-Rezeptorantagonisten

Suramin

Suramin (= Germanin®) wird eigentlich als Kurzinfusion zur Therapie der afrikanischen Trypanosomiasis bzw. der Onchozerkose eingesetzt. Von der Gruppe um W. H. Moolenaar wurde Suramin, ein komplexes, LPA in keiner Weise ähnelndes Molekül, als spezifischer LPA-Inhibitor bei Fibroblasten beschrieben (van Corven et al., 1992). An Thrombozyten zeigte sich in unseren Experimenten eine unspezifische Wirkung: Zum einen weist Suramin einen ausgesprochen starken agonistischen Eigeneffekt auf, der in Ausmaß und Verlauf sehr ungewöhnlich ist. Bei den für Fibroblasten beschriebenen Dosen von 70µM kommt es zu einer über Minuten progredienten

und irreversiblen Transmissionsabnahme im Aggregometer, im Ausmaß stärker als mit jedem anderen Agonisten (Abbildung 22); es finden sich hier vereinzelt lysierte Plättchen im Mikroskop. Zum zweiten waren die Thrombozyten auch nach geringen Dosen um die $2,5\mu\text{M}$, durch die die Oszillationen im Aggregometer meist zunahm, während die Transmissionsänderung in Richtung und Ausmaß variierte, durch fast keinen Agonisten mehr stimulierbar (z.B. zeigten selbst $10\mu\text{M}$ ADP keinerlei Wirkung) ausgerechnet abgesehen von LPA, welches immer noch Gestaltwandel in Höhe von 80-90 % der Kontrolle induzierte (Tabelle 13, nächste Seite).

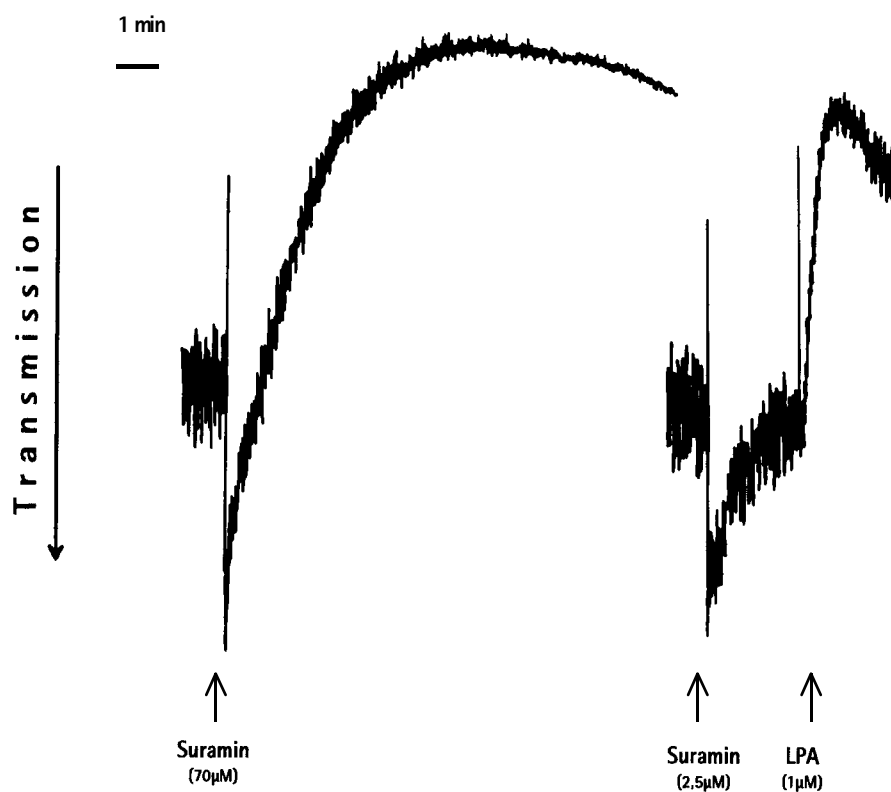


Abb. 22: Effekt von Suramin auf isolierte Thrombozyten

Die linke Kurve gibt die Plättchenreaktion auf $70\mu\text{M}$ Suramin wieder; es zeigt sich eine Transmissionsabnahme, die in Dauer und Ausmaß den Gestaltwandel durch andere physiologische Agonisten bei weitem übertrifft. Verzögert nehmen auch die Oszillationen dauerhaft ab. Bei der rechten Kurve wurde Suramin mit $2,5\mu\text{M}$ niedriger dosiert; es zeigt sich eine Oszillationszunahme bei abnehmender Transmission. Eine anschließende Stimulation mit $1\mu\text{M}$ LPA hat einen kaum beeinflussten thrombozytären Formwandel zur Folge.

Tab. 13: Hemmeffekt von Suramin auf unterschiedliche Plättchenagonisten

Agonist	finale Konzentration des Agonisten	Gw. in % der Kontrolle
ADP	1-10 μ M	0
YFLLRNP	300 μ M	0
Thrombin	0,1U	0
mox-LDL	200 mg/l	76
LPA(18:1)	1 μ M	82
PAF	50nM	90
LPC(16:0)	30 μ M	98

Der Suramin-Hemmeffekt auf Thrombozyten ist unspezifisch. Die links aufgeführten Agonisten wurden zu mit 5-10 μ M Suramin vorbehandelten isolierten Plättchen gegeben und der resultierende Formwandel in Relation zur nicht-vorbehandelten Kontrolle angegeben.

N-Palmitoyl-Tyrosin- und N-Palmitoyl-Serin-Phosphorsäure (NPTyrPA, NPSerPA)

Von den Gruppen um A. Tokomura, G. Tigyi und R. Bittman wurden N-Palmitoyl-L-Tyrosin-Phosphorsäure (NPTyrPA, siehe Abbildung 2, S. 18) und N-Palmitoyl-L-Serin-Phosphorsäure (NPSerPA) als spezifische kompetitive Antagonisten von LPA-Rezeptoren beschrieben – zwei Moleküle mit einer gewissen Strukturverwandtschaft zu (Palmitoyl-)LPA. Beide Substanzen besitzen an Plättchen eine geringe agonistische Eigenaktivität, hemmen jedoch die Thrombozytenaggregation durch LPA (Sugiura et al., 1994). In unseren Experimenten zeigte sich die Hemmwirkung von NPTyrPA anfangs der von NPSerPA überlegen (wohl chargenbedingt), weshalb in den folgenden Experimenten bevorzugt das Tyrosinderivat verwendet wurde. Wie in Abbildung 23a (nächste Seite) dargestellt, verhinderte bzw. reduzierte es dosisabhängig den thrombozytären *Gestaltwandel* durch Oleoyl- oder Palmitoyl-LPA ebenso, wie den durch modifizierte Lipoproteine (getestet an mox-LDL, mox-HDL₃, ox_T-LDL), während alle sonstigen getesteten Agonisten in ihrer Wirkung nicht beeinflusst waren (ADP, YFLLRNP). Zu einer vollständigen Hemmung waren meist Konzentrationen von 10-20 μ M nötig (Tabelle 14, S. 84; es sind die reinen Aggregometerversuche in relevanten Dosisbereichen dargestellt; die Ergebnisse der zahlreichen zusätzlichen Experimente, beispielsweise mit Aliquotabnahme oder in anderen Dosisbereichen, decken sich mit den dargestellten). Bei höheren Dosierungen zeigten NPTyrPA und NPSerPA zunehmende Eigenaktivität, wodurch nur noch bedingt gegenüber einem Desensibilisierungseffekt unterschieden werden konnte (Abbildung 23c).

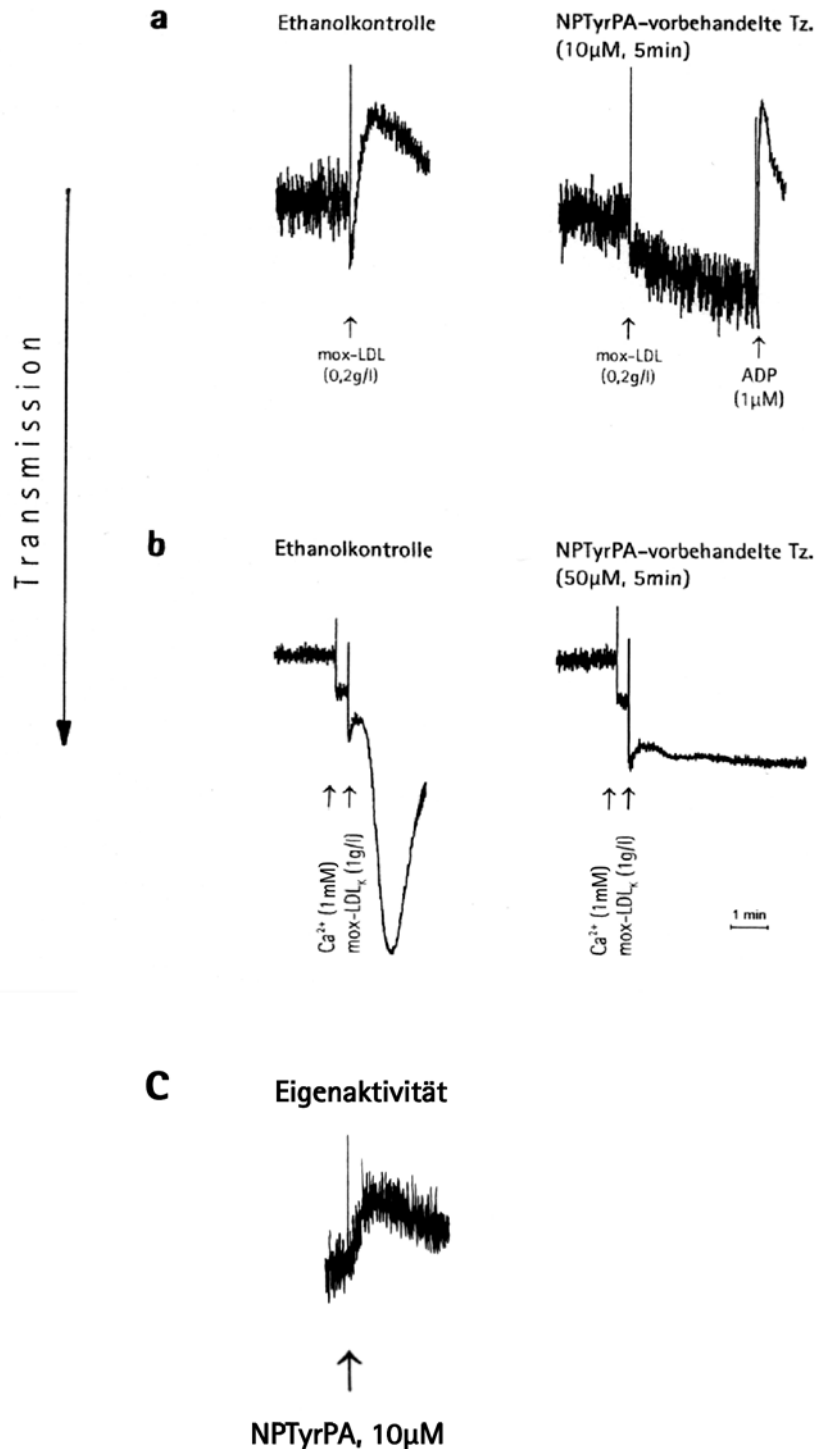


Abb. 23: Hemmung der durch mox-LDL induzierten Thrombozytenantwort durch den LPA-Rezeptorantagonisten NPTyrPA (Aggregometer)

- a) Durch fünfminütige Vorbehandlung isolierter Thrombozyten mit 10μM NPTyrPA wird der Formwandel durch 200 mg/l mox-LDL gehemmt.
- b) Durch fünfminütige Vorbehandlung isolierter Thrombozyten mit 50μM NPTyrPA wird die Aggregation durch 1 g/l mox-LDL gehemmt. Experimente unter Anwesenheit von 2% PPP; 15 Sekunden vor Zugabe von mox-LDL wurde 1mM Ca²⁺ vorgelegt.

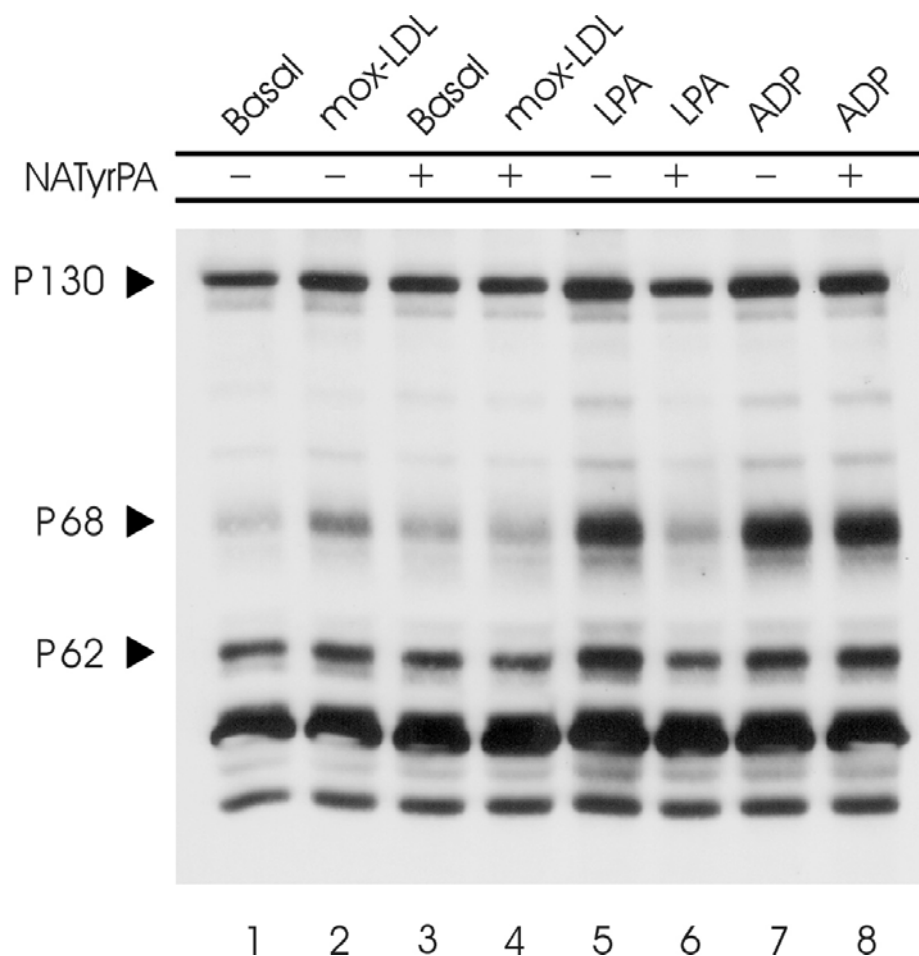


Abb. 24: Hemmung der durch mox-LDL induzierten Proteintyrosinphosphorylierung in Thrombozyten durch LPA-Rezeptorantagonisten

Die Plättchensuspension wurde mit NPTyrPA (Bahnen 3, 4, 6, 8) bzw. dem Lösungsmittel Ethanol (Bahnen 1, 2, 5, 7) für 5 min. vorinkubiert. Danach wurde Pufferlösung (Bahnen 1 und 3), 200 mg/l mox-LDL (Bahnen 2 und 4), 1 μ M LPA (Bahnen 5 und 6) oder 1 μ M ADP (Bahnen 7 und 8) zugegeben.

Die mikroskopischen Untersuchungen bestätigten die aggregometrischen Ergebnisse (Abbildung 10, Seite 52).

Ebenso konnte mit den LPA-Rezeptorantagonisten der Anstieg in der Tyrosinphosphorylierung der Plättchenproteine P62, P68 und P120 via LPA, mox-LDL oder mox-HDL verhindert werden, während er für andere Agonisten unbeeinflusst blieb (Abbildung 23).

Auch die durch mox-LDL induzierte Thrombozytenaggregation konnte durch NPTyrPA gehemmt werden (Abbildung 23b).

Tab. 14: Hemmung des *mox*-Lpp-induzierten Formwandels durch LPA-Rezeptorantagonisten

Antagonist (NPTyrPA)	Agonist	Anzahl der Versuche	Gw. in % der Kontrolle MW \pm SA
5 μ M	LPA (0,5-1 μ M)	n = 3	44 \pm 39 %
10 μ M	LPA (0,4-1 μ M)	n = 11	28 \pm 27 %
20 μ M	LPA (0,5 μ M)	n = 1	0 %
5 μ M	<i>mox</i> -LDL _K (200-500 mg/l)	n = 5	18 \pm 30 %
10 μ M	<i>mox</i> -LDL _K (200 mg/l)	n = 7	8 \pm 14 %
5 μ M	<i>mox</i> -HDL ₃ (200 mg/l)	n = 1	52 %
10 μ M	<i>mox</i> -HDL ₃ (200 mg/l)	n = 3	12 \pm 12 %
10 μ M	ox _T -LDL (200 mg/l)	n = 2	47 \pm 11 %
10 μ M	ADP (1 μ M)	n = 3	111 \pm 18 %
10 μ M	YFLLRNP (300 μ M)	n = 2	97 \pm 9 %

IV. Bestimmung der Lysophosphatidsäure in Lipoproteinen

1. Biologische Aktivitätsmessung von Extrakten und Eluaten

Die bisher erzielten Ergebnisse ließen vermuten, daß während der milden Oxidation von Lipoproteinen Lysophosphatidsäure entsteht, die für die Thrombozyten-aktivierende Wirkung verantwortlich ist. Diese Hypothese sollte im Rahmen der folgenden chemischen Analyse bewiesen werden.

Biologische Aktivität von Lipidextrakten

Im ersten Schritt wurde eine zweiphasige Lipidextraktion der Lipoproteine in Anlehnung an E. G. Bligh und W. J. Dyer (1959) durchgeführt. Die Chloroform-Methanolphase enthielt insbesondere Neutralfette, Phosphatidylcholine und Lysophosphatidylcholine (LPC). Die so gewonnenen Lipid-extrakte riefen nur geringe Thrombozytenantworten hervor, etwa Grundlinienverschiebungen in Richtung einer geringeren Transmission. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Extrakten nativer und modifizierter Lipoproteine. Auch war in diesen Extrakten kaum [³H]-LPA-Tracer nachweisbar (ca. 2% der eingesetzten Gesamtaktivität).

Im nächsten Schritt wurde eine butanolische Extraktion des verbliebenen Proteininterfaces durchgeführt: Die *butanolischen Extrakte* modifizierter Lipoproteine, die den Großteil an LPA enthielten (ca. 80% der eingesetzten Gesamtaktivität des [^3H]-LPA-Tracers; Abbildung 8), induzierten einen *deutlichen Gestaltwandel* der Thrombozyten ($n = 8$). Diese Formwandel waren im Mittel sogar stärker ausgeprägt, als die durch die analogen mox- oder mm-Lpp-Gaben direkt verursachten. Bei allen Extrakten kam es zu einem ausgeprägten Aktivitätsanstieg während der milden Oxidation (jw. LDL und HDL: $n = 3$), lediglich in einem Versuch rief auch der nat-LDL-Extrakt einen nennenswerten Formwandel hervor. Vor allem bei HDL wurden zur Abschätzung der Aktivität der Extrakte Dosis-Wirkungskurven mit LPA(18:1), vereinzelt auch LPA(16:0) gegenübergestellt: Während die Aktivität der nat-HDL-Extrakte im Mittel verschwindend gering war (in zwei von drei Experimenten keine Aktivität, im dritten deutlich unter 0,5 nmol LPA pro mg HDL-Proteinanteil), konnte für die mox-HDL-Extrakte eine Aktivität festgestellt werden, die in der Größenordnung von 0,5-1 nmol LPA pro mg HDL-Protein lag ($n = 3$; Tabelle 15a). Die Extrakte von nat-LDL zeigten eine geringe Eigenaktivität (im gegen eine LPA-Eichkurve abgeglichenen Versuch $< 0,4$ nmol/mg LDL-Protein). Die Aktivität der Extrakte von mox-LDL lag jeweils darüber (im gegen eine LPA-Eichkurve abgeglichenen Versuch ca. 1-2 nmol/mg LDL-Protein; Tabelle 15a).

Biologische Aktivität von in Lipoproteinen enthaltener Lysophosphatidsäure (LPA-Eluate) und deren Veränderung während der Oxidation

Auf Ebene der Extrakte arbeitet man immer noch mit Lipidgemischen, während nach ihrer dünnschichtchromatographischen Auftrennung in den Eluaten die nur durch LPA verursachte Aktivität erfaßt werden kann. Dazu wurde die jw. Lysophosphatidsäure von der DC-Matrix eluiert und der durch das Eluat verursachte Gestaltwandel quantifiziert (^3H -LPA-Recovery ca. 15%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 15b wiedergegeben ($n = 7$). Es ist ein *deutlicher Anstieg der Aktivität während der milden Oxidation* festzustellen. Soweit innerhalb des jw. Experiments auch Dosis-Wirkungskurven mit synthetisiertem LPA zum Vergleich angefertigt wurden, konnte die Aktivität der einzelnen Eluate eingeschätzt werden: Dabei wies mox-LDL die deutlichste Aktivität auf, mit gut einem Drittel darunter folgte mox-HDL; die individuellen Schwankungen waren jedoch größer, als dieser Unterschied (Tabelle 15b). Insgesamt lag die Aktivität der Eluate *milde oxidierter Lipoproteine in der Größenordnung von 1 nmol/mg Proteinanteil*. Wie schon die Extrakte, so zeigten auch die Eluate stärkere biologische Aktivitäten, als die korrespondierenden

Lipoproteinsuspensionen. Dieser Effekt erschien im Vergleich zu den Extrakten nicht wesentlich stärker oder schwächer ausgeprägt.

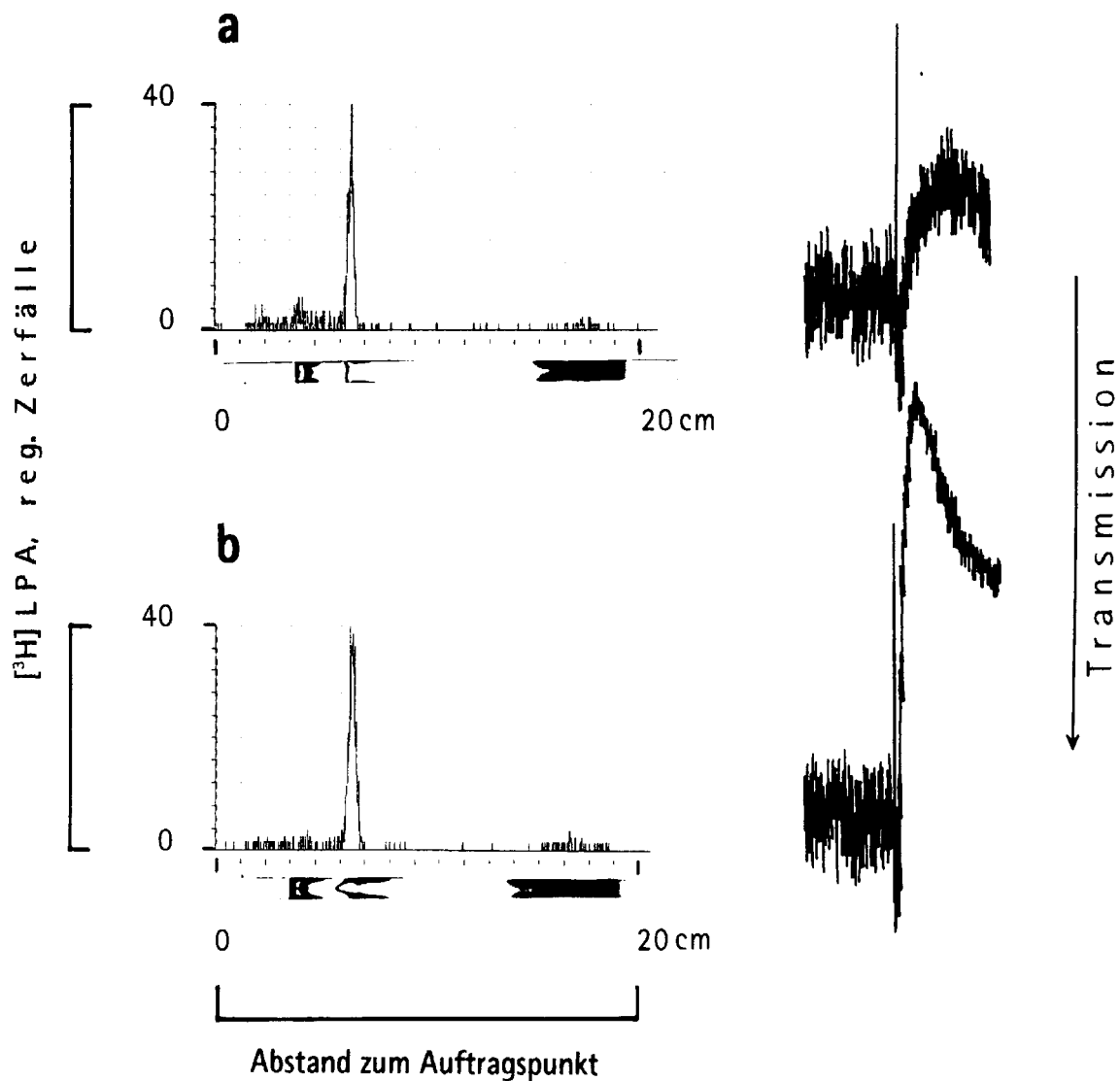


Abb. 25: LPA-Quantifizierung mittels biologischer Aktivitätsmessung

Hier ist die Auftrennung der Extrakte auf einer Whatman-DC-Platte im System nach Cohen und Derksen für nat-LDL (a) und mox-LDL (b) dargestellt. Über dem Photostreifen der Jod-exponierten Bahn ist das zugehörige Ergebnis des DC-Linearanalysegerätes abgebildet; der Gipfel rührt von der Strahlung her, die durch den tritiierten LPA-Standard emittiert wird (registrierte Zerfälle = counts). Zur Rechten ist eine repräsentative Kurve des Formwandels nach Plättchenstimulation durch das entsprechende LPA-Eluat angeführt. Eluate von Zonen, die wenige mm unter- oder oberhalb des $[^3\text{H}]$ LPA-Peaks gewonnen wurden, enthielten keine Aktivität mehr (nicht abgebildet).

Tab. 15: *Biologische Aktivität von butanolischen Lipidextrakten und LPA-Eluaten von Lipoproteinpräparationen*

a) Extrakte

Versuch	Lipoprotein	Recovery	Gw. in cm (Bsp.)	Biologisch gemessene LPA-Menge
1	nat-LDL	41	2,2	< 0,4 nmol/mg Prot.
	mox-LDL	39	9,5	1-2 nmol/mg Prot.
2	nat-LDL	96	6,7	-
	mox-LDL	64	8,2	-
3	nat-LDL	54	2,1	-
	mox-LDL	65	9,5	-
4	nat-HDL	42	0	-
	mox-HDL	34	13 / rev. Agg.	-
5	nat-HDL	18	0	„0“ nmol/mg Prot.
	mox-HDL	33	3,6	1 nmol/mg Prot.
6	nat-HDL	40	0	„0“ nmol/mg Prot.
	mox-HDL	60	5,7	0,25-0,5 nmol/mg Prot.
7	nat-HDL	58	0	-
	mox-HDL	55	4,4	-
8	nat-HDL	74	3	<< 0,5 nmol/mg Prot.
	mox-HDL	75	8,8	0,5-1 nmol/mg Prot.

b) Eluate

Versuch	Lipoprotein	Recovery	Gw. in cm (Bsp.)	Biologisch gemessene LPA-Menge
1	mm-LDL	6	8,1	0,15-0,25nmol/mg Prot.
2	nat-LDL	16	3,9	-
	mox-LDL	17	5,2	-
3	nat-LDL	2	0,7	0,2 nmol/mg Prot.
	mox-LDL	3	3,2	1,2 nmol/mg Prot.
4	nat-LDL	13	1,4	0,3 nmol/mg Prot.
	mox-LDL	15	6,6	1,3-1,5 nmol/mg Prot.
5	nat-HDL	7	3,5	< 0,2 nmol/mg Prot.
	mox-HDL	8	12,1	0,75 nmol/mg Prot.
6	nat-HDL	7	0	-
	mox-HDL	5	5,3	-
7	nat-HDL	3	5,0	-
	mox-HDL	5	6,4	-

Biologische Aktivität von butanolischen Extrakten (a) und LPA-Eluaten (b): Für eine jw. identische Menge im Vergleich von nativem zu milde oxidiertem Lipoprotein ist beispielhaft auch der erzielte Gw. angegeben. Die LPA-Äquivalenzstoffmenge (rechte Spalte) ist nur angegeben, soweit parallel Standardeichkurven mit synthetisiertem LPA(meist: 18:1) durchgeführt wurden. Es zeigt sich durch die milde Oxidation im Mittel ein Anstieg der biologischen Aktivität auf die Größenordnung von etwa einem nmol pro mg Lpp-Proteinanteil.

2. Biologische Aktivität anderer Lipidfraktionen

Aktivität der Eluate anderer Lipidfraktionen

Es wurde in einem weiteren Ansatz geklärt, ob LPA die einzige relevante, rasch wirksame Thrombozyten-aktivierende Substanz in modifizierten Lipoproteinen darstellt. Hierzu wurden die Gesamtlipide von nat-LDL_K und von mox-LDL_K in einem zweidimensionalen DC-System fraktioniert, in einem Albuminpuffer gelöst und zur Plättchensuspension gegeben. Es fand sich eine geringe Aktivität der Lysophosphatidylcholin-Fraktion (LPC) aus mox-LDL_K, wie sie aus Vorarbeiten von C. Corrinth et al. bereits angedeutet worden war (unveröffentlichte Daten bzw. Siess et al., 1999). LPC konnte im Sinne der Fragestellung aber ausgeschlossen werden, weil es (1) eher unspezifisch-lytische als gezielt-agonistische Effekte hervorrief, weil es (2) keinerlei Desensibilisierungseffekte zeigte und weil (3) die Aktivität der LPC-Fraktion auch relativ niedrig war (jw. ca. 5–20% des butanolischen Extrakts bzw. LPA-Eluats). Darüber hinaus konnte der LPC-Effekt nicht durch NPTyrPA oder NPSerPA antagonisiert werden. LPC reichert sich bei einer Extraktion nach E. G. Bligh und W. J. Dyer nahezu vollständig in der Chloroformphase an und mag somit zu einem gewissen Grad zur geringen Aktivität dieser Chloroformextrakte beitragen. In keiner der übrigen Lipidfraktionen konnte eine Thrombozyten-aktivierende Wirkung nachgewiesen werden, insbesondere auch keine Aktivitätsanstiege während der Oxidation (siehe Tabelle 16).

Tab. 16: Aktivität der einzelnen Lipidfraktionen aus nativem und milde oxidiertem LDL

Lipidfraktion	nat-LDL (Gw. in % d. Ktr.)	mox-LDL (Gw. in % d. Ktr.)
Neutrallipide:	0	0
Sphingomyelin (SM):	0	0
Phosphatidylcholin (PC):	0	0
Phosphatidylethanolamin (PE):	0	0
Lysophosphatidylcholin (LPC):	26	21
Lysophosphatidsäure (LPA):	40	100 (Ktr.)

Wie die Tabelle anhand der Ergebnisse einer Präparation zeigt, stellt LPA für die Plättchenaktivierung die einzige nennenswerte aktive Substanz dar. Die LPA-Eluate wurden wie üblich mit Hilfe der sequentiellen Lipidextraktion präpariert. Die Eluate der übrigen Lipide wurden durch eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie aus der Chloroform-Methanolphase gewonnen und einer Menge von 100 µg LDL (Proteinanteil) entsprechend dosiert. Die mit Abstand höchste Aktivität fand sich erwartungsgemäß in der LPA-Fraktion von mox-LDL (als 100% gesetzt).

Exkurs: Prozentuale Veränderung der Lipidgruppen in HDL während der milden Oxidation

In einem orientierenden Versuch wurden (analog zu früheren Experimenten an LDL) die Stoffmengen der Lipidgruppen in HDL₃ und ihre Veränderung während der milden Oxidation bestimmt. Die mittels einer zweidimensionalen DC aufgetrennten Lipide wurden durch eine Phosphatbestimmung quantifiziert (Bartlett, 1959). Im Gegensatz zu LPA sind die Stoffmengen hier ausreichend. Es zeigte sich ein Anstieg der LPC-Fraktion während der milden Oxidation von < 1% auf ca. 8-9% der gesamten mit Chloroform/Methanol extrahierbaren Lipide. Eine ähnlich deutliche, gegenläufige Veränderung konnte nur für Phosphatidylethanolamin (PE) festgestellt werden, welches von ca. 6% auf < 1% abnahm (Tabelle 17).

Tab. 17: Prozentualer Anteil der Lipidgruppen in HDL₃ und ihre Veränderung während der milden Oxidation

	nat-HDL ₃	mox-HDL ₃
Lysophosphatidylcholin (LPC)	0,2 %	8,9 %
Sphingomyelin (SM)	10,9 %	15,3 %
Phosphatidylinositol (PI)	5,6 %	5,2 %
Phosphatidylcholin (PC)	75,5 %	70,2 %
Phosphatidylethanolamin (PE)	5,9 %	0,3 %

3. Versuche mit LPA-angereicherten Lipoproteinen

In weiteren Experimenten wurden native Lipoproteine mit unterschiedlichen Mengen LPA angereichert und 10 min. bei 37°C inkubiert (anr-LDL bzw. anr-HDL), um zu sehen, ob die alleinige Anwesenheit von LPA in Lipoproteinen zur Aktivierung von Thrombozyten ausreicht und ggf. die resultierende Aktivität zu bestimmen. *Sowohl mit LPA angereichertes LDL als auch HDL zeigten die erwartete Bioaktivität.* Dosis-Wirkungskurven für LPA-angereichertes LDL zeigten eine geringere Aktivität, als für freie LPA gleicher finaler Konzentration (Tabelle 18, nächste Seite). Dies paßt zu dem bereits ausgeführten Befund, daß auch Lipidextrakte und LPA-Eluate stärkere Plättchenantworten hervorrufen, als das intakte, milde oxidierte Lipoproteinpartikel.

Tab. 18: Dosis-Wirkungsverhältnis bei LPA-angereichertem LDL;
Vergleich mit freier LPA und mox-LDL

	Gw. in cm
LDL (= nat-LDL)	0,0
LDL + LPA 0,2 μ M (= anr-LDL)	1,6
LDL + LPA 0,5 μ M (= anr-LDL)	1,7
LDL + LPA 1 μ M (= anr-LDL)	4,0
LDL + LPA 2 μ M (= anr-LDL)	6,2
LDL + LPA 5 μ M (= anr-LDL)	7,3
LDL + LPA 10 μ M (= anr-LDL)	7,7
LPA 0,5 μ M (in Ethanol)	6,8
LPA 1 μ M (in Ethanol)	7,5
mox-LDL 0,2 g/l, Charge 1	5,6
mox-LDL 0,2 g/l, Charge 2	3,8

Innerhalb einer Präparation wurde nat-LDL mit unterschiedlichen Mengen LPA angereichert (anr-LDL), jw. 10 min. inkubiert und mit fixer finaler Konzentration von 200 mg/l LDL bei zwischen 0 und 10 μ M variierender Konzentration von LPA zur Plättchensuspension gegeben. Innerhalb derselben Präparation wurden durch LPA (0,5 μ M, frei, in Ethanol gelöst) 6,8 cm Gw. und 1 μ M 7,5 cm Gw. erreicht, also merklich stärkere Effekte als für anr-LDL, das mit 0,5 bzw. 1 μ M LPA angereichert worden war. In diesem Versuch sind für identisch starke Aktivierungsreaktionen in anr-LDL ca. fünffach höhere LPA-Mengen erforderlich, als in der freien Form. Mit zwei verschiedenen mox-LDL-Präparationen wurden Gw. mit 5,6 bzw. 3,8 cm ausgelöst.

D. Diskussion

I. Methodendiskussion

1. Mox-LDL als *in-vitro*-Modell der atheromatösen Läsion

Durch kupferkatalysierte Oxidation von LDL *in vitro* können auf reproduzierbare und verhältnismäßig einfache Weise im Oxidationsgrad variier- und steuerbare LDL-Formen hergestellt werden, die in ihren Eigenschaften den unterschiedlichen, *in vivo* vorkommenden oxidierten LDL-Spezies ähneln. A. Weidtmann et al. (1995) etablierten unlängst eine vergleichsweise hochkonzentrierte, eher leicht oxidierte Variante (mox-LDL), das in Versuchen zur Aggregation maximale biologische Wirkung zeigte und auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand. Weitere Versuche zum thrombozytären Formwandel wiesen nach, daß mox-LDL wie ein physiologischer Agonist wirkt (Baumann-Siemons, 2000). Zudem bietet der konzentrierte Ansatz methodische Vorteile, insbesondere werden Verdünnungseffekte bei der Addition zum Effektor-Zellsystem, hier isolierten Thrombozyten, vermieden.

Das HDL analog zu oxidieren, fand seine Rechtfertigung zunächst in der physikochemischen Beschaffenheit: LDL und HDL wiesen hier weitgehende Ähnlichkeiten auf, Diene, Triene und biologische Aktivität veränderten sich in etwa vergleichbar in Geschwindigkeit, Verlauf und Gesamtausmaß, während der Proteinanteil in beiden Fällen nicht erkennbar oxidativ modifiziert wurde (Tabelle 8, S. 55f).

Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit Vergleiche mit anderen Modifikationsverfahren durchgeführt. Den einzelnen Methoden lagen verschiedene Mechanismen zugrunde: Mox-, ox_T- und ox_S-Lpp wurden durch unterschiedlich intensive kupferkatalysierte Oxidation erzeugt, SIN-Lpp durch direkten Angriff von Radikalen und mm-Lpp durch eine Autoxidation über einen längeren Zeitraum. Die biologischen Aktivitäten schwankten zwischen einzelnen Blutspendern und der individuellen Präparation mehr, als in Abhängigkeit vom gewählten Oxidations-

verfahren; dies gilt gerade auch für die beiden leichter oxidierten und zugleich bioaktivsten Versionen, mox- und mm-Lpp. Eine direkte Korrelation der biologischen Aktivität zum Gehalt konjugierter Diene ließ sich nicht nachweisen.

In der Gesamtschau behauptete sich die milde Oxidation nach A. Weidtmann et al. als eleganteste Methode. Sie führt am reproduzierbarsten zu stark Thrombozyten-aktivierenden Lipoproteinen, ist mit den wenigsten Fehlermöglichkeiten behaftet und bietet gegenüber der minimalen Modifikation nach J. A. Berliner et al. den Vorteil ungleich zügigerer Abläufe und damit besserer Planbarkeit. Es liegt in konzentrierter Form vor und kann direkt für die Versuche an isolierten Thrombozyten eingesetzt werden, während im Gegensatz dazu die bei starken Verdünnungen zu oxidierenden ox_T - und ox_S -Präparationen erst langwierig konzentriert werden müssen, um nicht allzu große Verdünnungsartefakte im Aggregometer auszulösen. Die Oxidation mit SIN-1 in der von A. Weidtmann vorgeschlagenen Form ist im Vergleich geringfügig unzuverlässiger und führt zu etwas weniger aktiven Lpp-Spezies; außerdem schließen SIN-1-Reste in der Lipoproteinsuspension eine adäquate Messung der Desensibilisierung aus.

2. Desensibilisierungsassay mit gewaschenen Thrombozyten

Gewaschene Thrombozyten stellen ein seit langem etabliertes Modellsystem zur Untersuchung von Aktivierungsvorgängen dar. Gegenüber Vollblut oder plättchenreichem Plasma (PRP) sind bei der Arbeit mit einer reinen Plättchensuspension maskierende, meist hemmende Fremdeinflüsse, etwa durch Albumin oder endogene Lipoproteine, ausgeschlossen; das System gewinnt somit an Sensitivität als auch an Spezifität. Im Vergleich zu anderen Zellkulturen lassen sich Thrombozyten rasch und unproblematisch gewinnen und präparieren, was zusätzlich den Vorteil bietet, eine Vielzahl von Spendern zu untersuchen. Die Verwendung humaner Zellen ermöglicht unmittelbare Rückschlüsse auf die pathophysiologische Relevanz der Befunde: Nur Plättchen von Schafen und Katzen antworten (neben humanen Thrombozyten) auf LPA (Gueguen et al., 1999). Leider reagieren auch die Plättchen von Mäusen nicht auf LPA (eigene Beobachtungen).

Die Vorteile der isolierten Thrombozyten kommen insbesondere während der Arbeit mit dem Desensibilisierungsassay zum tragen: Das Abklingen der Erstantwort kann im Aggregometer in Echtzeit beobachtet werden. Bei geeigneter Wahl der Konzentrationen sind die Plättchenantworten auf LPA oder mox-Lpp wirklich vollständig reversibel; dies gilt für den Formwandel, gemessen im Aggregometer oder morphologisch, und ebenso für die Proteintyrosinphosphorylierung.

Die Verwendung des Desensibilisierungsassays war zur Charakterisierung der Thrombozyten-aktivierenden Substanz in mox-Lpp entscheidend. Die systematische Fraktionierung und biologische Testung von LDL- oder HDL-Lipiden ohne die Zielvorgabe LPA wäre nicht nur ungleich aufwendiger gewesen, sondern die relativ hydrophile Lysophosphatidsäure wäre aus methodischen Gründen durch die klassische Lipidextraktion mit Chloroform und Methanol vermutlich nie erfaßt worden (vgl. Bjerve et al., 1974).

3. Quantifizierung der Lysophosphatidsäure in Lipoproteinen

Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zur quantitativen Erfassung von in Lipoproteinen enthaltener Lysophosphatidsäure

Für die exakte Quantifizierung der in Lipoproteinen enthaltenen Lysophosphatidsäure waren mehrere Probleme zu beachten:

1. Die LPA-Konzentrationen sind insbesondere in nat-Lpp (mit $< 0,1$ nmol/mg Protein) ausgesprochen niedrig, die Quantifizierungsverfahren mußten somit sehr sensitiv sein.
2. Den relativ geringen LPA-Mengen stehen große Mengen anderer Lipide gegenüber, es mußten also sehr potente Trennungsvorgänge eingesetzt werden.
3. Aufgrund seiner untypisch polaren Natur wurde mit den bislang gängigen Methoden der Lipidextraktion von Lipoproteinen LPA nicht extrahiert; somit mußte eine neue Methode zur quantitativen und möglichst kompletten Extraktion von LPA aus Lipoproteinen entwickelt werden.

Diese Schwierigkeiten konnten weitestgehend durch die Etablierung eines mehrschrittigen Verfahrens in den Griff gebracht werden, welches im wesentlichen auf der relativen Polarität von LPA beruht. Obschon sich die einzelnen Elemente der Lipidfraktionierung aus bewährten Verfahren rekrutieren, wurden in der speziellen Kombination neue Wege beschritten. Die zweischrittige Lipidextraktion erwies sich als sehr probates Mittel, unter Elimination des Großteils der Lipoproteinlipide (Cholesterin, Cholesterinester, Phosphatidylcholin, Sphingomyelin) die Lysophosphatidsäure quantitativ und möglichst rein zu erhalten. Recoverymessungen bestätigten die Zuverlässigkeit der Methode, allerdings erfordert sie gewissenhaftes Vorgehen; insbesondere muß angesichts der verhältnismäßig hohen Stoffmengen darauf geachtet werden,

daß keine Überladung der jeweiligen Phasen mit den einzelnen Lipiden stattfindet. Die sich anschließende Dünnschichtchromatographie (DC) stellt einen klassischen und vielbeschrifteten Weg zur Analyse und Gewinnung von LPA dar (Cohen et al., 1971, Gerrard et al., 1984); die Ergebnisse sind – auch dank des tritierten Standards – eindeutig und reproduzierbar. Ein weiteres Problem stellte die möglichst weitgehende Elution der Proben von der Kieselgelmatrix dar, wie sie für die biologische Aktivitätsmessung erforderlich war: Trotz der wiederholten Elution konnte in diesem Schritt jeweils nur ein Teil der LPA-Menge von der Kieselgelmatrix abgelöst werden, so daß die finale Recovery von LPA mit ca. 15% relativ niedrig war.

Schwierigkeit einer direkten Stoffmengenmessung mittels Phosphatbestimmung

Neben der LPA-Quantifizierung mittels biologischer Aktivitätsmessung wäre selbstverständlich auch eine direkte Stoffmengenmessung wünschenswert. Die unterschiedlichen LPA-Spezies könnten in ihrer Gesamtheit am ehesten mit Hilfe einer Phosphatbestimmung erfaßt werden, wie sie auch für die größeren Lipidgruppen durchgeführt wurde (Kapitel C IV). Dieser stehen allerdings die genannten Schwierigkeiten ganz besonders entgegen, da klassische Phosphat-Assays eine für unsere Maßgaben zu geringe Sensitivität aufweisen (Bartlett 1959). Dabei störten hohe Werte von »Blanks« (i.e. von leeren Stellen der DC-Platte). Zuverlässige Messungen ließen sich nur über ca. 5 nmol erreichen. Sensitivere Methoden mittels Farbverstärkern scheiterten u.a. an Interaktionen mit der Kieselgelmatrix; so wurde etwa das in diesem Kontext bevorzugt verwendete Malachitgrün (Hess und Derr, 1975; zuverlässig über ca. 0,5 nmol) in unseren Untersuchungen sofort gebunden und damit ausgefällt. Vermutlich böte hier eine Flüssigkeitschromatographie Vorteile gegenüber der einfachen DC. Die Gruppe um G. Tigyi aus Tennessee etablierte unlängst ein Verfahren, mit einer Kombination von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie LPA in Plasma zu bestimmen (Baker et al., 2000 und 2001). Mit diesem Verfahren könnte LPA in Lipoproteinen quantifiziert werden.

Quantifizierung mittels biologischer Aktivitätsmessung

Die Quantifizierung der biologischen Aktivität bietet gegenüber der reinen Stoffmengenbestimmung eine Reihe von Vorteilen: Rein methodologisch ist die ausgesprochen hohe Sensitivität des Testverfahrens hervorzuheben, weshalb es im Gegensatz zur Phosphatbestimmung im Bereich der optimalen Auflösung eingesetzt werden konnte und somit zuverlässige Werte erbrachte. Es besteht keine Gefahr, die Lösungsmittelphasen während des Extraktionsverfahrens zu übersättigen, es wird bei diesen geringeren Stoffmengen eine gute

Trennschärfe mit der DC-Methode erreicht, die Kontrolle der Recovery kann über das gesamte Experiment bequem gemessen werden.

Aus medizinischer Sicht ist der Anstieg der biologischen LPA-Aktivität während der Lipoproteinoxidation ohnehin interessanter, als der zu erwartende Anstieg der LPA-Stoffmenge, da die LPA-Aktivität unter anderem je nach Fettsäureseitenkette variiert, somit nicht einfach von der Stoffmenge auf die Thrombozytenantwort umgerechnet werden kann.

Mit der Quantifizierung der biologischen Aktivität ist alleine nicht der Anstieg der LPA-Stoffmenge während der Lipoproteinoxidation definitiv bewiesen, sondern der Anstieg biologischer Aktivität eines über den LPA-Rezeptor wirkenden Agonisten, der sich chromatographisch wie LPA verhält. Allerdings erscheint diese Schlußfolgerung Vereinfachung zulässig (und wird in der folgenden Diskussion auch so durchgeführt) angesichts: (1) der bisherigen Ergebnisse zur hohen Spezifität des/der thrombozytären LPA-Rezeptors/-en, welche(r) nicht einmal durch strukturell sehr ähnliche Lipide wie Sphingosin-1-Phosphat nennenswert aktiviert wird/werden – nach neueren Beobachtungen EC_{50} von S-1-P: $13 \pm 7 \mu M$ in Vergleich zu LPA(18:0): $15 \pm 5 nM$ (E. Rother, unveröffentlichte Daten); (2) der exakten Chromatographie der biologischen Aktivität mit radioaktiven LPA-Markern in verschiedenen DC-Systemen; (3) der praktischen Abwesenheit von Thrombozyten-aktivierender Wirkung anderer Lipidfraktionen.

4. Lysophosphatidsäure und LPA-ähnliche Lipide

Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen LPA-ähnlichen Lipiden

Die Frage nach der Spezifität des thrombozytären LPA-Rezeptors soll hier aus anderer Perspektive nochmals aufgegriffen werden. Beide untersuchte LPA-Spezies zeigten einen deutlichen thrombozytären Gestaltwandel bei unterschiedlichen Dosen im nanomolaren Bereich (Oleoyl- nicht signifikant aktiver als Palmitoyl-LPA).

Inzwischen wurden von mehreren Arbeitsgruppen zahlreiche LPA-ähnliche Lipide synthetisiert, die sich zum Teil in zentralen Strukturmerkmalen unterscheiden und entsprechend deutlich unterschiedliche Wirkung auf die bislang charakterisierten Rezeptoren bzw. ihre Zellsysteme ausüben. In einer frühen Arbeit stellten A. Tokumura et al. (1981) diesbezüglich erste systematische Untersuchungen an Thrombozyten an. Sie betonten dabei die Bedeutung einer keilförmigen Molekülstruktur für eine maximale aggregationsinduzierende Wirkung. Von unmittelbar PAF-ähnlichen Verbindungen (allerdings mit Esterbindung in sn-1-Position)

abgesehen, zeigten Varianten mit einer Kopfgruppe am Phosphatrest (z. B. LPC, LPE) in Übereinstimmung mit unseren Untersuchungen keine Aktivität. Die Variation der Fettsäureseitenkette in der sn-1-Position ergab ein Aktivitätsmaximum für (16:0)-LPA (das auch von uns verwendete Palmitoyl-LPA). Längere Fettsäurereste führten zu einer graduellen Abnahme der aggregationsauslösenden Wirkung, bei Veresterung kürzerer Fettsäurereste stellten sich rasche Wirkverluste ein, so mußte etwa (12:0)-LPA bereits ca. 30-fach höher dosiert werden als (16:0)-LPA. Schließlich wurden in dieser Arbeit auch LPA-ähnliche Verbindungen untersucht, bei denen zusätzlich kurze Fettsäurereste an die sn-2-Position verestert wurden; interessanterweise fand sich für diese Verbindungen ebenfalls eine kontinuierliche Abnahme ihrer Aktivität, die für (16:0/4:0)-PA immerhin noch ca. 10% der (16:0)-LPA-Wirkung betrug. Ein Angriff auch dieser Substanzen an einem LPA-Rezeptor scheint folglich glaubhaft, obschon ihre Potenz deutlich geringer zu sein scheint. Theoretisch könnten derartige Lipide während der Lipoproteinoxidation durch einen Bruch der Fettsäureseitenkette (im angeführten Beispiel an der sn-2-Position) aus Phosphatidsäure (PA) entstehen. Interessant ist auch der Vergleich mit Lipiden, die andere Kopfgruppen am Phosphatrest tragen: Dort kommt es bei Veränderungen von Seitenketten nicht zu graduellen, sondern ausgeprägten Veränderungen der Aktivität: Beispielsweise kann die Substitution (Azylierung) einer 2:0-Seitenkette in die sn-2-Position von LPC (inaktiv) zu einer PAF-ähnlichen Verbindung mit maximaler Aktivität führen – dann wohl allerdings mit Angriff am PAF-Rezeptor.

In einer späteren Arbeit (Sugiura et al., 1994) wurden schwerpunktmäßig PAF-ähnliche und LPA-ähnliche Verbindungen gegenübergestellt. In Übereinstimmung mit älteren Ergebnissen einer französischen Arbeitsgruppe (Simon et al., 1982) zeigten sich die Alkyl-LPA-Spezies potenter, eine Aggregation zu induzieren, als die Azyl-LPA-Moleküle; z. B. mußte (16:0)-Azyl-LPA fast 20-fach höher dosiert werden, als (16:0)-Alkyl-LPA. Daneben wurden Aktivitätsprofile einer Reihe, z. T. bizarrer, aufwendig synthetisierter Strukturen untersucht, im Zuge dessen auch die von uns verwendeten LPA-Antagonisten NPTyrPA und NPSerPA erstmals Erwähnung fanden. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, daß auch in an die vorliegende Arbeit anschließenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe mit einem zweidimensionalen DC-System, welches zusätzlich zu S-1-P auch 1-Alkenyl-LPA und weitere LPA-ähnliche Verbindungen zu separieren vermag, die Thrombozyten-aktivierende Substanz in mox-LDL mit Azyl-LPA komigrierte (Siess et al., 1999).

LPA-Rezeptorbesatz auf Thrombozyten

Nachdem in den letzten Jahren die G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptoren näher charakterisiert worden waren (Übersichten in Goetzl und An, 1998; Lynch und Im, 1999; Hla et al., 2001), wurden von mehreren Arbeitsgruppen erneut Untersuchungen mit fraglichen LPA-Analoga an Thrombozyten aufgegriffen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen erwies sich Sphingosin-1-Phosphat nur als schwacher Agonist in höheren Dosen um 40 μ M (Gueguen et al., 1999; Motohashi et al., 2000). Mit zyklischem 1-Azyl-*sn*-glycero-3-phosphat (cPA) und einem Dioxazaphosphocan-Derivat (DOXP-H) wurden zusätzliche, konzentrationsabhängig inhibitorisch wirksame Verbindungen charakterisiert (Gueguen et al., 1999). In derselben Arbeit konnte eine Desensibilisierung der Plättchen gegenüber LPA nach Gabe *und* anschließendem Entfernen schwach wirksamer Agonisten (hier v.a. Sphingosin-1-Phosphat erwähnenswert) gezeigt werden. Außerdem mutmaßten die Autoren, der thrombozytäre LPA-Rezeptor sei nicht identisch mit LPA₁ oder LPA₂, da sie keine mRNA für Edg-1 bis Edg-4 nachweisen konnten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Gruppe um Motohashi (2000), die in Plättchen mittels RT-PCR die Expression aller drei bislang beschriebenen LPA-Rezeptoren nachweisen zu können glauben und zusätzlich mit S1P₄ (= Edg 6) einen Rezeptor für Sphingosin-1-Phosphat. Eine schlüssige Erklärung für diese Widersprüche kann von den Beteiligten derzeit noch nicht gegeben werden, von Gueguen wird auf technische Probleme angesichts des bekanntermaßen geringen Vorkommens von mRNA in Plättchen verwiesen. Allerdings stünden auch beide Erklärungsmodelle in keinem Widerspruch zu unseren Ergebnissen, die auch mit der postulierten Präsenz mehrerer LPA-Rezeptoren auf Plättchen in Deckung gebracht werden können.

Im Rahmen der bereits angesprochenen Untersuchungen mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie können zukünftig die bei der Lipoproteinoxidation entstehenden LPA-Spezies näher charakterisiert werden (Baker et al., 2001). Es ist wahrscheinlich, daß die entstehende LPA ein Gemisch verschiedener Subspezies darstellt.

II. Lysophosphatidsäure als Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen?

1. LPA-Entstehung durch Oxidation von Lipoproteinen

Erstbeschreibung eines neuen Weges der LPA-Bildung während der Lipoproteinoxidation

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, entsteht durch die milde Oxidation von 1 mg LDL oder HDL (Proteinanteil) eine Äquivalenzstoffmenge entsprechend 0,8-1 nmol LPA. Damit wird neben aktivierten Thrombozyten in Verbindung mit exogener Lyso-PLD und anderen, in Kapitel A, Seite 13 angeführten Wegen zur LPA-Bildung, ein weiterer, bislang unbekannter Bildungsweg dieses hochpotenten Lipidmediators beschrieben. Bei den bisher beschriebenen Fällen wird LPA gewöhnlich ins Blut freigesetzt und dort rasch an Albumin und andere Plasmaproteine – vermutlich in geringerem Umfang auch an die dort zirkulierenden Lipoproteine – gebunden. Wenn man hingegen eine der Situation *in vitro* vergleichbare Lipoproteinoxidation auch im Subendothelialraum postuliert, kann sich LPA dort anreichern und unmittelbar stimulierend auf die benachbarten Zellen wirken, insbesondere Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen, was Entstehung und Wachstum von Plaques stark beschleunigen dürfte.

Mechanismus der LPA-Bildung noch unklar

Der genaue Mechanismus der LPA-Entstehung während der Oxidation ist noch nicht geklärt. Es könnten einerseits Enzyme daran beteiligt sein. Andererseits könnte es sich um chemische Prozesse im Sinne direkter Oxidationsfolgen handeln. Beide Hypothesen haben ihr »für und wider«:

Sollten an der LPA-Entstehung während der Lipoproteinoxidation Enzyme beteiligt sein, müßten diese gleichermaßen assoziiert mit LDL, HDL₂ und HDL₃ vorkommen, da alle drei Lipoproteinspezies in unseren Experimenten gleichermaßen während der milden Oxidation an biologischer Aktivität gewannen.

Als attraktive Hypothese erscheint die Bildung von LPA aus Lysophosphatidylcholin (LPC), katalysiert durch die Lysophospholipase Lyso-PLD. Ein Anstieg der LPC-Fraktion in LDL während der milden Oxidation konnte in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (C. Corinth, unveröffentlichte Ergebnisse), analoge Ergebnisse für HDL₃ erbrachte die vorliegende Arbeit. LPC

könnte katalysiert durch die Phospholipase PLA_2 aus Phosphatidylcholin (PC) gebildet werden. Dieses Ausgangsmaterial PC ist in LDL, HDL_2 und HDL_3 jeweils reichlich vorhanden, sein Anteil unterscheidet sich zwischen den drei Lipoproteinspezies nicht wesentlich. PLA_2 findet sich im Plasma und ist dort zu ca. 70% assoziiert mit LDL und zu ca. 30% mit HDL (Stafforini et al., 1987). Gemäß detaillierterer Untersuchungen findet sich die PLA_2 -Aktivität v.a. assoziiert mit kleineren und dichten LDL- bzw. HDL-Subfraktionen (LDL-5: ca. 24% der Gesamtaktivität im Plasma; V-HDL: ca. 20%; Tselepis et al., 1995). Mehrere Gruppen sprechen dieser PLA_2 zu, bevorzugt kurze Fettsäureseitenketten an der sn-2-Position zu hydrolysieren, also Moleküle als Substrat zu haben, wie sie im Rahmen der oxidativen Fragmentierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren entstehen (Stremmler et al., 1989; Tew et al., 1996). Es wurde gefunden, daß diese PLA_2 mit der in der vorliegenden Arbeit bereits diskutierten PAF-AH identisch ist (Tew et al., 1996). Interessanterweise zeigten klinische Studien, daß eine erhöhte Plasmakonzentration der lipoproteinassoziierten PLA_2 einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt (Packard et al., 2000). Auch eine PLD-Aktivität findet sich im Plasma, insbesondere auf die bereits angesprochene Lysophospholipase (Lyso-PLD), die LPC zu LPA hydrolysiert sei hier verwiesen (Aoki et al., 2002). Eine Assoziation mit Lipoproteinen ist bislang nicht nachgewiesen. Interessanterweise ist diese Lyso-PLD identisch mit Autotaxin, eine die Motilität von Tumorzellen stimulierende Ektophosphodiesterase, der auch eine Rolle in der Angiogenese zugeschrieben wird (Moolenaar, 2002).

Diesen Überlegungen einer allein enzymatisch bedingten LPA-Entstehung steht entgegen, daß analog zur milden Oxidation über 24 Stunden, aber ohne Cu^{2+} bzw. ohne SIN-1 präpariertes mm-LDL nur einen geringen biologischen Aktivitätsanstieg während der Inkubation bei 37°C zeigte, während SIN-1-LDL und v.a. mox-LDL jedesmal eine deutliche Bioaktivität aufwiesen. Durch 24-stündige Inkubation entsprechend gewonnenes mm-HDL induzierte sogar in zwei von drei Fällen keinen thrombozytären Formwandel. Da zumindest für SIN-1 schwer vorstellbar ist, daß es die enzymatische Katalyse beschleunigt, spricht dieses Ergebnis für eine Rolle oxidativer Prozesse. Des weiteren beeinflussten im Zuge unserer Experimente orientierend durchgeführte Hemmungen der PAF-AH (= PLA_2) während der milden Oxidation die Bildung rasch Thrombozyten-aktivierender Substanzen nicht oder zumindest nur unwesentlich (C. Corrinth, unveröffentlichte Daten).

Sollte LPA hingegen im Rahmen direkter Oxidationsprozesse entstehen, verwundert, daß die klassischen Oxidationsparameter, die sonst für die Lipidperoxidation herangezogen werden (konjugierte Diene, Triene und die orange Färbung des LDL als Marker des

Antioxidantiengehalts), nicht streng mit der biologischen Aktivität oxidierter Lipoproteine bzw. dem LPA-Gehalt korrelieren.

2. LPA stellt die Thrombozyten-aktivierende Substanz oxidierter Lipoproteine dar

Die während der milden Oxidation von Lipoproteinen (LDL und HDL) gebildete Lysophosphatidsäure (LPA) ist verantwortlich für deren Thrombozyten-aktivierende Wirkung. Dies wird durch das Ausmaß der Aktivierungsreaktion, die Abwesenheit weiterer wesentlicher Plättchenstimuli in milde oxidierten Lipoproteinen und die identische Signaltransduktion (reversible Stimulation der Proteintyrosinphosphorylierung) belegt. Interessanterweise liegt die Aktivität des reinen LPA-Eluates sogar über der des jw. mox-Lpp-Gesamtpartikels, was durch an die vorliegende Arbeit anschließende Rekonstitutionsversuche (LPA-Eluat mengenäquivalent mit nat-LDL desselben Spenders rekonstituiert) unserer Arbeitsgruppe noch unterstrichen wurde: Hier zeigten die reinen Eluate die drei- bis vierfache Aktivität gegenüber den jw. entsprechenden LDL-Präparationen (Siess et al., 1999). Dies könnte über eine geringere Zugänglichkeit der Lpp-gebundenen LPA-Moleküle erklärt werden (beispielsweise vergleichbar dem erwähnten Dissoziationsgleichgewicht von freier und Albumin-gebundener LPA). Mutmaßlich beruht der Hemmeffekt nativer Lipoproteine auf den thrombozytären Formwandel induziert durch mox-LDL, mox-HDL oder LPA auf demselben Mechanismus, zumindest deuten die Versuche mit anr-Lpp in diese Richtung.

3. Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für die Situation *in vivo*

Überlegungen zur arteriellen Thrombose und späten Stadien der Arteriosklerose

Während über die mögliche pathophysiologische Relevanz des Vorkommens von LPA im Subendothelialraum für die frühe Phase der Arterioskleroseentstehung derzeit noch keine zuverlässige Aussage getroffen werden kann, liegen die Implikationen für die fortgeschrittenen Stadien der Arteriosklerose, insbesondere die Auslösung einer akuten Thrombusbildung nach *Plaqueruptur* recht nahe. Wenn das Material im Lipidkern weicher Plaques den oxidierten Lipoproteinen gleicht, würde bei einer Plaqueruptur LPA ins Gefäßlumen freigesetzt und trüge dann maßgeblich zur Aktivierung zirkulierender Thrombozyten bei. Dieser Mechanismus würde

erklären, wieso nach Beobachtungen der Gruppe um V. Fuster das atheromatöse Material aus dem Zentrum lipidreicher Plaques bis zu sechsfach thrombogener wirkt als andere, auch weit kollagenreichere Plaqueanteile (Fernández-Ortiz et al., 1994). Dieser Pathomechanismus könnte die Basis fulminanter arterieller Thrombosen und Thromboembolien und somit z.B. letaler Infarkte bilden. Die Aktivierung von Thrombozyten an ulzerierten Plaques hätte wiederholte Mikroemboli zur Folge. Derart gebildete Mikroaggregate können beispielsweise im Stromgebiet der Carotiden bereits apparativ im klinischen Bereich nachgewiesen werden. Plättchenaktivierung durch LPA könnte zudem die *Apposition* von Thrombozyten an kleine und kleinste Fissuren der fibrösen Kappe auslösen, welche ein grundlegender Mechanismus der instabilen Angina pectoris sein dürfte.

Mit der in dieser Arbeit beschriebenen und anschließend weiterentwickelten LPA-Quantifizierungsmethode wurden lipidreiche Plaques aus Carotis- und Femoralarterien-desobliterationen untersucht (Siess et al., 1999). Im Vergleich zu plaquefreier arterieller Intima zeigte das Endatherektomiematerial einen erhöhten LPA-Gehalt von 10–49 pmol/mg Feuchtgewicht (gegenüber 1,2–2,8 pmol/mg), und Lipidextrakte bzw. DC-Eluate induzierten einen thrombozytären Formwandel über die Aktivierung des LPA-Rezeptors. Der höchste LPA-Gehalt wurde in der Kernregion nachgewiesen, wo sich histologisch große Lipidablagerungen und zahlreiche Schaumzellen fanden, während die lipidärmeren und bindegewebigen Bereiche (Plaqueschulter und distaler Bereich) nur wenig LPA enthielten. Auch fand sich keine nennenswerte Aktivität in anderen Lipidgruppen. Insofern scheinen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde durchaus Relevanz für die Situation *in vivo* zu besitzen.

Überlegungen zu Initiation und frühen Stadien der Arteriosklerose

Bereits im Verlauf der meist langwierigen Arterioskleroseentwicklung eingreifen zu können, wäre zweifellos weit attraktiver, als in fortgeschrittenen Stadien »die Notbremse zu ziehen« und dadurch zumindest thrombotische bzw. thromboembolische Komplikationen zu vermindern bzw. vermeiden. Daher sollen neben den naheliegenden Implikationen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Plaqueruptur und Thrombose auch die früheren Stadien kurz diskutiert werden.

Intravasale Wechselwirkung

Im Gegensatz zu ox-LDL dürften mox- oder mm-LDL kaum über rasche Säuberungsmechanismen der Leber (»Clearance-Funktion«) aus dem Intravasalraum entfernt werden, weil das Apo B-100

nahezu unverändert ist und somit nicht als Ligand des Scavenger-Rezeptors fungiert. Tatsächlich wurde von verschiedenen Autoren, insbesondere der Gruppe um P. Avogaro, die Existenz einer elektronegativen bzw. kleinen und dichten LDL-Subfraktion beschrieben, die Eigenschaften leicht oxidierten LDL-Spezies aufweist und bzgl. mehrerer physikochemischer Parameter dem LPA-enhaltenden mm-LDL ähneln soll (Avogaro et al., 1988 und 1991); inzwischen wurde diese als »LDL-« (elektronegatives LDL) bezeichnete Fraktion näher charakterisiert (Hodis et al., 1994; Sevanian et al., 1997). Eine weitere Arbeitsgruppe fand eine ähnliche, rascher oxidierbare LDL-Subpopulation allerdings nur in geringen Mengen (< 1% des Gesamt-LDL; Shimano et al., 1991). Es wäre interessant, den LPA-Gehalt in diesen LDL-Spezies zu bestimmen. Bei einem Anteil von 5-20% des Gesamt-LDL könnte diese durchaus von Bedeutung sein: Eine Interaktion zwischen LPA-reichen Lipoproteinen und Thrombozyten auch in der Zirkulation wäre denkbar, die beispielsweise zu einer erhöhten Plättchenaggregabilität führen könnte, wie sie bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet wurde. Dazu passend wurde eine höhere Prävalenz der benannten atherogenen LDL-Subfraktion bei KHK-Patienten beschrieben. Nach derzeitigem Erkenntnisstand könnten Interaktionen zwischen zirkulierenden, gering oxidierten LDL-Subfraktionen und Blutplättchen die intravaskuläre Thrombenbildung an hämodynamisch kritischen Stellen mit turbulenten Strömungen und hohem Scherstreß begünstigen.

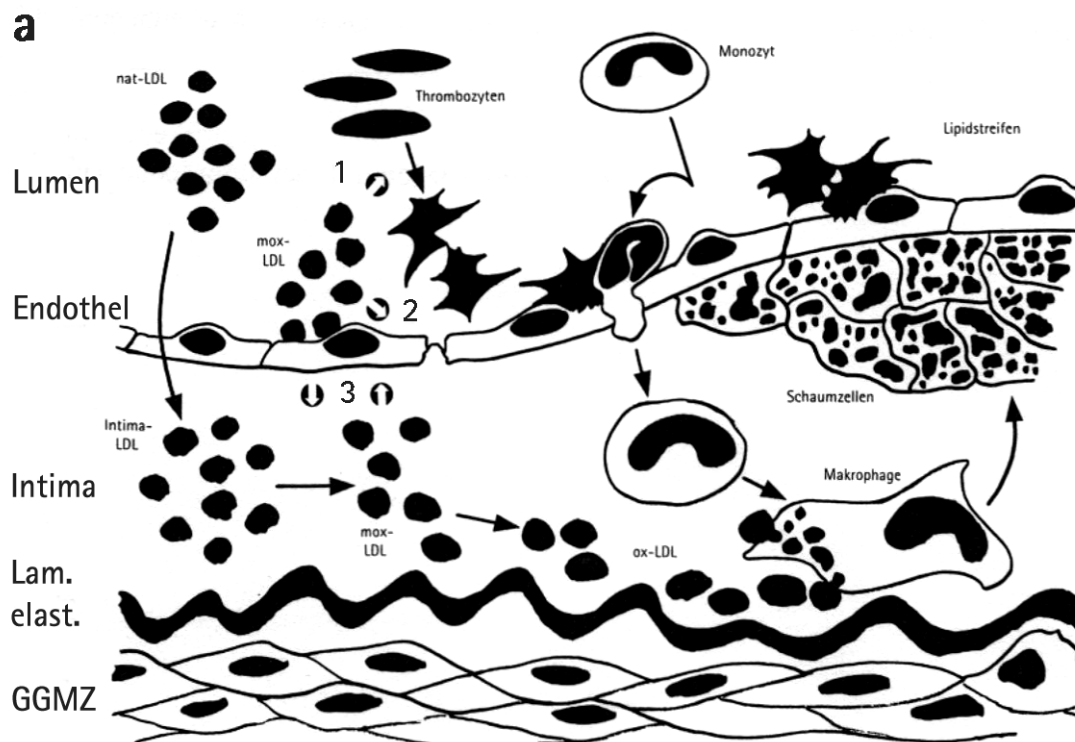
Subendotheliale Wechselwirkung

Wie schon mehrfach erwähnt, wirkt LPA auf eine ganze Reihe arterioskleroserelevanter Zellen (siehe Tabelle 3, S. 15). Die Reizschwelle von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Gefäßmuskulzellen läge niedrig genug, daß Aktivierungsreaktionen durch mox-LDL-ähnliches Material zu erwarten wären. Da diese Zellen im Subendothelialraum gebildeter LPA wohl auf Dauer ausgesetzt wären und nicht - wie die Thrombozyten in den vorliegenden Experimenten - nur zu einem bestimmten Zeitpunkt, ist allerdings völlig unklar, welche Rolle in diesem Kontext Desensibilisierungsvorgänge spielen. Ebenso offen ist, ob die LPA-bedingte Zellproliferation zu einer Lumenverengung, aber parallelen Plaquestabilisierung führen würde oder ob destabilisierende Wirkungen im Vordergrund stünden, etwa aufgrund zellulärer Streßreaktionen und der Aktivierung von Makrophagen mit der konsekutiven Degradierung fibröser Plaquestrukturen.

Inzwischen liegen Ergebnisse zu LPA- und mox-LDL-induzierten Effekten an Endothelzellen vor. LPA und das in mox-LDL enthaltene LPA (Siess et al., 1999) führt über die Aktivierung von Rho

und Rho-Kinase zur Phosphorylierung leichter Myosinketten (Essler et al., 2000). Es kommt zur Bildung von Aktin-Stressfasern, zur Kontraktion von Endothelzellen und damit zur Bildung interzellulärer Zwischenräume. Dieser Effekt wird verstärkt durch die Rho-medierte Lockerung von Tight junctions/Zonulae occludentes (Übersicht: Siess, 2002). Interessanterweise kann die LPA-induzierte Beeinträchtigung der endothelialen Barrierefunktion durch HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren (Statine) abgemildert werden (Essler et al., 2000; van Nieuw Amerongen et al., 2000). Darüber hinaus erhöht LPA in Endothelzellen die Genexpression von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, ICAM-1, IL-8, MCP-1) und führt so zu einer erhöhten Adhäsion und Transmigration von Monozyten am Endothel (Übersicht: Siess, 2002). Allerdings kann die Expression von LPA-Rezeptoren auf Endothelzellen je nach Herkunft (z.B. arteriell, venös) und Kulturbedingungen variieren (siehe Siess, 2002).

Abbildung 26 spiegelt den Versuch wider, mögliche Stellen des Wirksamwerdens von LPA im Arterioskleroseprozeß aufzuzeigen.



b

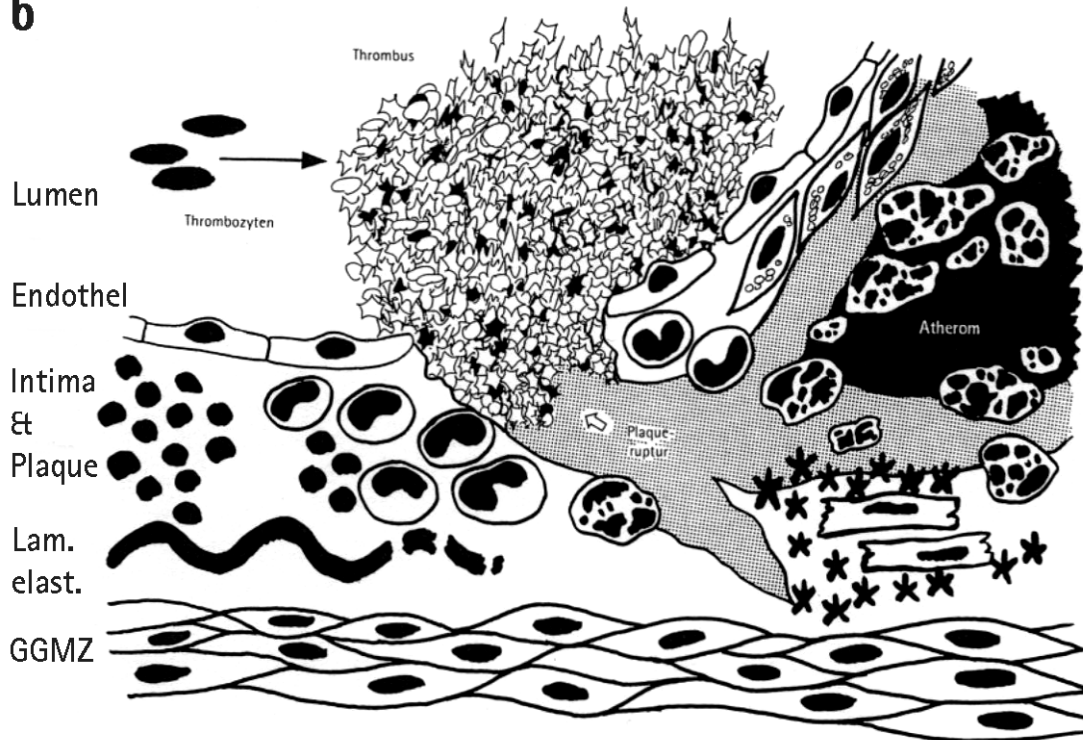


Abb. 26: Mögliche Funktionen von oxidierten Lipoproteinen und darin enthaltener Lysophosphatidsäure in der Pathogenese von Arteriosklerose und Thrombose

(Lam. Elast.: Lamina elastica; GGMZ: Glatte Gefäßmuskulzellen.)

- a) Frühe Läsion: Zirkulierendes ox-LDL (»LDL-«) könnte intravasal zur Aktivierung von Thrombozyten führen (1) oder auf Endothelzellen einwirken (2) und beispielsweise die Barrierefunktion des Endothels verringern. Ebenso sind Wechselwirkungen zwischen subendotheliales ox-LDL und Endothelzellen vorstellbar (3).
- b) Plaqueruptur und Thrombusbildung: Bei der Ruptur einer lipidreichen Plaque kommt es zur Freisetzung des Kernmaterials. Die darin enthaltene Lysophosphatidsäure führt zur Thrombozytenaggregation und damit zur Bildung eines arteriellen Thrombus.

III. LDL und HDL: Gegenspieler mit Gemeinsamkeiten

Daß LDL und HDL *in vivo* als Gegenspieler angesehen werden, fußt auf klinischen Untersuchungen sowie ihrer antagonistischen Rolle im Cholesterintransport, wonach insbesondere ein erhöhter LDL-HDL-Quotient stark atherogen wirken soll. Diese Theorie ist allerdings nicht völlig unumstritten – zumindest was die scheinbar protektive Wirkung des HDL betrifft. Eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse führte zu Versuchen, die Lipoproteingruppen nicht primär nach

ihrer hydratisierten Dichte, sondern nach physiologischen Gesichtspunkten einzuteilen und solche mit besonderen Eigenschaften zu selektieren, wie dies in Form von Lp(a) und der oben benannten dichten LDL-Subfraktion bzw. »LDL-« für einige überdurchschnittlich atherogene Spezies gelungen zu sein scheint. Weit fraglicher stellt sich die Situation für mutmaßlich protektive Spezies dar. Für HDL sind Situationen beschrieben, in denen es seine protektive Wirkung einbüßt und beispielsweise proinflammatorisch wirkt (van Lenten et al., 1995). Manche Befunde, wie etwa das Vorhandensein verschiedener HDL-Reste in Plaques (Guyton und Klemp, 1996), führten sogar zu der Theorie, Erniedrigungen des HDL-Spiegels seien nur Folge von Veränderungen mit ihm verknüpfter und unmittelbarer arteriosklerosebezogener Faktoren (z.B. gegensinnig erhöhte Triglyzerinspiegel), anstatt unmittelbare Ursache einer Progression.

In der vorliegenden Arbeit waren keine Unterschiede zwischen *mox*-HDL und *mox*-LDL, einen Formwandel von Thrombozyten hervorzurufen, festzustellen. Ebenso fand sich bei der LPA-Quantifizierung der Extrakte und Eluate kein signifikanter Unterschied zwischen *mox*-LDL oder -HDL; beide lagen in der Größenordnung von etwa 1 nmol Palmitoyl-LPA/mg (bei allerdings noch geringen Fallzahlen; Tabelle 15, S. 87).

Dem stehen folgende Unterschiede entgegen:

1. Von den zahlreichen Präparationen zeigte niemals *nat*-HDL eine Thrombozyten-aktivierende Eigenschaft, auch das aus der Langzeitpräparation stammende nicht, ganz im Gegensatz zu LDL. Dies spiegelt sich auch bei der Aktivität der Extrakte nativer Lipoproteine wieder, wo in drei von vier Versuchen durch den *nat*-HDL-Extrakt kein Formwandel von Plättchen ausgelöst werden konnte (Tabelle 15a, S. 87); der LPA-Gehalt von *nat*-HDL dürfte somit niedriger liegen, als der von *nat*-LDL. Es kann spekuliert werden, ob dies auf einen Anteil bereits milde oxidierten, zirkulierenden LDLs (»LDL-«, elektronegatives, dichtes LDL) zurückgeführt werden könnte. Unterschiede der hepatischen Clearancefunktion bezüglich LDL oder HDL könnten hier zum Tragen kommen.
2. Im Gegensatz zum Gestaltwandel konnte mit *mox*-HDL zudem keine eindeutige Thrombozytenaggregation ausgelöst werden. Es wäre denkbar, daß *mox*-LDL Substanzen enthält, die die LPA-Wirkung verstärken. Dies wurde etwa für Lysophosphatidylcholin (LPC) gezeigt (C. Corinth, unveröffentlichte Daten und eigene Beobachtungen). Allerdings konnte auch bei HDL ein Anstieg der LPC-Fraktion während der milden Oxidation von < 1% auf ca. 8-9% der gesamten mit Chloroform/Methanol extrahierbaren Lipide nachgewiesen werden, so daß dieser Unterschied zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend erklärt werden kann.

IV. Perspektive

Noch ist der Mechanismus der LPA-Entstehung während der milden Oxidation von Lipoproteinen ungeklärt. Ein detailliertes Verständnis der hieran beteiligten Vorgänge böte unter Umständen die Möglichkeit, frühzeitig pharmakologisch zu intervenieren. Insbesondere wäre es interessant, ob Enzyme, wie die benannten Phospholipasen PLA₂ und (Lyso-)PLD daran beteiligt sind, denn sie stellen möglicherweise spezifisch beeinflussbare Zielstrukturen dar.

Die bislang bekannten Antagonisten der LPA-Rezeptoren weisen entweder eine relevante intrinsische Aktivität auf oder wirken nur *in vitro*. Die Entwicklung von *in vivo* wirksamen, spezifisch die einzelnen thrombozytären LPA-Rezeptoren hemmenden Substanzen erscheint somit dringend wünschenswert. Neben der Vorbeugung thrombotischer bzw. thrombo-embolischer Ereignisse ließe sich mit solchen Mitteln vielleicht auch die Rate Gp IIb-IIIa-Antagonisten bedingter Blutungskomplikationen während interventioneller Eingriffe senken.

Sobald man den spezifischen Rezeptorbesatz einzelner Zielzellen kennt und zu inhibieren vermag, könnte man einerseits die verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Wechselwirkungen ungleich besser einschätzen und andererseits auch gezieltere Modelle pharmakologischer Einflußnahme entwickeln. Allerdings ist eher ein komplexes Muster an Interaktionen zu erwarten, denn LPA stellt einen bedeutenden Wachstumsfaktor für vielerlei Zelltypen dar. In diesem Kontext ist zu erwähnen, daß *in vitro* sogar ein und dieselbe Endothelzelllinie ihr Muster der LPA-Rezeptorexpression im Rahmen unterschiedlicher Kulturbedingungen veränderte (siehe Siess, 2002). Es ist vorstellbar, daß Veränderungen der Genexpression einzelner Zellspezies auch *in vivo* stattfinden. Ebenso ist die Rolle von Desensibilisierungsreaktionen *in vivo* derzeit noch völlig unklar.

Schließlich stellt sich angesichts oxidativ veränderter, zirkulierender LDL-Spezies (»LDL-«) die epidemiologisch und prophylaktisch bedeutsame Frage, inwieweit klinisch der LPA-Spiegel im Blut bzw. Plasma oder auch der LDL-assoziierte LPA-Gehalt als Risikofaktor für atherosklerotisch bedingte Erkrankungen angesehen werden kann.

E. Zusammenfassung

Lysophosphatidsäure gilt als einer der grundlegendsten und wichtigsten Mediatoren höherer Organismen, sie wirkt als Wachstumsfaktor bzw. Aktivator auf eine Vielzahl von Effektorzellen. In der vorliegenden Arbeit wird ein bislang unbekannter Weg der LPA-Entstehung während der Modifikation von Lipoproteinen nachgewiesen und die entstandene LPA mit Hilfe einer neu etablierten Methode der sequentiellen Lipidextraktion von Lipoproteinen quantifiziert. So findet sich während der milden Oxidation von LDL ein deutlicher Anstieg des LPA-Gehalts auf eine Aktivität von etwa ein nmol Palmitoyl-LPA/mg mox-LDL-Protein. Dies ist eine Menge, die bei den bislang beschriebenen Zellsystemen nachweislich Effekte hervorruft.

Hier wurde dies für Thrombozyten aufgezeigt: Die in mox-LDL enthaltene LPA ruft dosisabhängig Gestaltwandel oder Aggregation in gewaschenen Thrombozyten hervor. Damit wurde erstmals die Thrombozyten-aktivierende Substanz in milde oxidierten Lipoproteinen benannt, quantifiziert und in einen funktionellen Kontext gestellt. Vergleichbare Resultate ergaben sich für verschiedene andere milde LDL-Modifikationsformen, wie mm-LDL und interessanterweise auch für analoge Modifikationen von HDL. Ganz wesentlich trug die Verwendung eines Desensibilisierungsassays zum Beweis bei, daß LPA der in all diesen modifizierten Lipoprotein-Spezies enthaltene, allein relevante Plättchenagonist ist.

Da oxidierte Lipoproteinspezies als Schlüsselemente in der Pathogenese von Arteriosklerose, Thrombose und kardiovaskulären Erkrankungen erachtet werden, rückt LPA ins Zentrum der Abläufe bei Plaqueruptur und arterieller Thrombose; es dürfte ebenfalls eine relevante Rolle spielen bei Initiation und Progression atheromatöser Veränderungen. Es ist zu erwarten, daß mox- und mm-Lpp in zu Plättchen vergleichbarer Weise auch weitere Effektorzellen aktivieren und beispielsweise zur Proliferation anregen, etwa Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen.

F. Literaturverzeichnis

1. Adgey, AAJ: An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Europ. Heart J.* 1998, **19** [Suppl. D], S. D10-D21
2. Aoki, J, Taira, A, Takanezawa, Y, et al., Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J. Biol. Chem.* 2002, in press
3. Ardlie, NG, Selley, ML, Simons, LA: Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1989, **76**, S. 117-124
4. Atger, V, Giral, P, et al.: High-density lipoprotein subfractions as markers of early atherosclerosis. *Am. J. Card. Jan/1995*, **75**, S. 127-131
5. Aufenanger, J, Kattermann, R: Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel; in Greiling, H, Gressner, HM: Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. *Schattauer* 1995³
6. Augé, N, Fitoussi, G, Nègre-Salvayre, A, et al.: Mildly oxidized LDL evokes a sustained Ca^{2+} -dependent retraction of vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1996, **79**, S. 871-880
7. Aviram, M, Brook, JG: Platelet interaction with high- and low-density lipoproteins. *Atherosclerosis* 1983, **46**, S. 259-268
8. Avogaro, P, Bittolo-Bon, G, Cazzolato, G: Presence of a modified low-density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis* 1988, **8**, S. 79-87
9. Avogaro, P, Cazzolato, G, Bittolo-Bon, G: Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. *Atherosclerosis* 1991, **91**, S. 163-171
10. Baker, DL, Umstot, ES, Desiderio, DM, Tigyi, GJ: Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions. *Ann. NY Acad. Sci.* 4/2000, **905**, S. 267-269
11. 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**, S. 287-295
12. Bartlett, GR: Phosphorus Assay in Column Chromatography. *J. Biol. Chem.* 3/1959, **234/3**, S. 466-468
13. Baumann-Siemons, J, Milde oxidiertes LDL stimuliert die Proteintyrosinphosphorylierung während des Gestaltwandels menschlicher Thrombozyten. *Dissertationsarbeit* 2000, Ludwig-Maximilians-Universität zu München
14. Bauer, M, Retzer, M, Siess, W, et al.: Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood* 1999, **94**, S. 1655-1672
15. Baurand, A, Eckly, A, Gachet, C, et al., Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: Differential down-regulation of the P2Y_1 and P2cyc receptors. *Thromb. Hemost.* 2000, **84**, S. 484-491

16. Beisiegel, U: Apolipoproteins as ligands for lipoprotein receptors; in Rosseneu, M: Structure and function of apolipoproteins. *CRC Press*, Boca Raton 1992
17. van der Bend, RL, Brunner, J, Moolenaar, WH, et al.: Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J.* 1992, **11/7**, S. 2495-2501
18. Berliner, JA, Navab, M, Fogelman, AM, et al.: Atherosclerosis: basic mechanisms – oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995, **91**, S. 2488-2496
19. Berliner, JA, Territo, MC, Fogelman, AM, et al.: Minimally modified low-density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J. Clin. Invest.* 4/1990, **85**, S. 1260-1266
20. Billah, MM, Lapetina, EG, Cuatrecasas, P: Phospholipase A₂ activity specific for phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 6/1981, **256/11**, S. 5399-5403
21. Bittmann, R, Swords, B, Liliom, K, Tigyi, G: Inhibitors of lipid phosphatidate receptors: N-palmitoyl-serine and N-palmitoyl-tyrosine phosphoric acids. *J. Lip. Res.* 1996, **37**, S. 391-398
22. Bjerve, KS, Daae, LNW, Bremer, J: The selective loss of lysophospholipids in some commonly used lipid-extraction procedures. *Anal. Biochem.* 1974, **58**, S. 238-245
23. Blatter, MC, James, RW, Messmer, S, et al.: Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. *Eur. J. Biochem.* 1993, **211**, S. 871-879
24. Bligh, EG, Dyer, WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, **37**, S. 911-917
25. Braunwald, E, Maseri, A, et al.: Rationale and clinical evidence for the use of GP IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *Europ. Heart J.* 1998, **19 [Suppl. D]**, S. D22-D30
26. Brook, JG, Aviram, M, Viener, A, et al.: High-density lipoprotein subfractions in normolipidemic patients with coronary atherosclerosis. *Circulation* 1982, **66/5**, S. 923-926
27. Brown, MS, Goldstein, JL: Scavenging for receptors. *Nature* 2/1990, **343**, S. 508-509
28. Burke, AP, Farb, A, Virmani, R, et al.: Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary artery disease who died suddenly. *N. Engl. J. Med.* 1997, **336**, S. 1276-1282
29. Campos, H, Roederer, GO, Krauss, RM: Predominance of large LDL and reduced HDL₂ cholesterol in normolipidemic men with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, **15**, S. 1043-1048
30. Carvalho, ACA, Colman, RW, Lees, RS: Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N. Engl. J. Med.* 2/1974, **290**, S. 434-438
31. Chisolm, GM, Irwin, KC, Penn, MS: Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes* 10/1992, **41 Suppl. 2**, S. 61-66
32. Chun, J, Contos, JJ, Munroe, D: A growing family of receptor genes for lysophosphatidic acid (LPA) and other lysophospholipids (LPs). *Cell Biochem. Biophys.* 1999, **30**, S. 213-242
33. Coffey, MD, Cole, RA, Colles, SM, Chisolm, GM: In vitro cell injury by oxidized low-density Lipoprotein involves lipid hydroperoxide-induced formation of alkoxyl, lipid, and peroxy radicals. *J. Clin. Invest.* 1995, **96**, S. 1866-1873

34. Cohen, P, Broekman, MJ, Derksen, A, et al.: Quantification of human platelet inositides and the influence of ionic environment on their incorporation of orthophosphate-³²P. *J. Clin. Invest.* 1971, **50**, S. 762-772
35. van Corven, EJ, Groenink, A, Moolenaar, WH, et al., Lysophosphatidate-induced cell proliferation: Identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 10/1989, **59**, S. 45-54
36. van Corven, EJ, van Rijswijk, A, Moolenaar, WH, et al.: Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts - Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J.* 1992, **281**, S. 163-169
37. Crouch, MF, Lapetina, EG, Dual mechanisms of platelet hormone receptor desensitization. *J. Biol. Chem.* 1/1989, **264/1**, S. 584-588
38. Cushing, SD, Berliner, JA, Fogelman, AM, et al.: Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7/1990, **87**, S. 5134-5138
39. Daniel, JL, Molish, IR, Rigmaiden, M, Stewart, G: Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J. Biol. Chem.* 1984, **259**, S. 9826-9831
40. Dargel, R: Lipid peroxidation - a common pathogenetic mechanism? *Exp. Toxic. Pathol.* 1992, **44**, S. 169-181
41. Dentan, C, Lesnik, P, Chapman, MJ, Ninio, E, PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation. *Arterioscler. Thromb.* 1994, **14**, S. 353-360
42. Dohlman, HG, Thorner, J: RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 2/1997, **272/7**, S. 3871-3874
43. Eichholtz, T, Jalink, K, Fahrenfort, I, Moolenaar, WH: The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem. J.* 1993, **291**, S. 677-680
44. Erdös, EG, Debay, CR, Westerman, MP: Activation and inhibition of the arylesterase of human serum. *Nature* 8/1959, **184**, S. 430-431
45. Essler, M, Retzer, M, Bauer, M, et al.: Stimulation of platelets and endothelial cells by mildly-oxidized LDL proceeds through activation of lysophosphatidic acid receptors and the Rho/Rho-kinase pathway - Inhibition by lovastatin. *Ann. NY Acad. Sci.* 4/2000, **905**, S. 282-286
46. Esterbauer, H, Dieber-Rotheneder, M, Waeg, G, et al.: Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* 1990, **3/2**, S. 77-92
47. Esterbauer, H, Gebicki, J, Puhl, H, Jürgens, G: The Role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 1992, **13**, S. 341-390
48. Esterbauer, H, Wäg, G, Puhl, H: Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Brit. Med. Bull.* 1993, **49/3**, S. 566-576
49. Falk, E, Prediman, KS, Fuster, V: Coronary plaque disruption. *Circulation* 8/1995, **92/3**, S. 657-671

50. Fernández-Ortiz, A, Badimon, JJ, Falk, E, et al., Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture. *J. Am. Coll. Cardiol.* 6/1994, **23/7**, S. 1562-1569
51. Fiske, CH, Subbarow, Y: The Colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925, **66**, S. 375-400
52. Fourcade, O, Simon, MF, Viodé, C, et al.: Secretory phospholipase A₂ generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 3/1995, **80**, S. 919-927
53. Fuentes, E, Nadal, Jacob, R, McNaughton, P: Action of serum and plasma albumin on intracellular Ca²⁺ in human endothelial cells. *J. Physiol.* 1997, **504.2**, S. 315-326
54. Fuster, V, Badimon, L, Cohen, M, et al.: Insights into the patogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation* 6/1988, **77/6**, S. 1213-1220
55. Gaits, F, Fourcade, O, Chap, H, et al.: Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett.* 1997, **410**, S. 54-58
56. Gerrard, JM, Kindom, SE, Peterson, DA, et al.: Lysophosphatidic acids - influence on platelet aggregation and intracellular calcium flux. *Am. J. Pathol.* 1979, **96**, S. 423-438
57. Gerrard, JM, Robinson, P: Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim. Biophys. Acta* 1989, **1001**, S. 282-285
58. Gerrard, JM, Robinson, P: Lysophosphatidic acid can activate platelets without increasing ³²P-labelling of phosphatidic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1984, **795**, S. 487-492
59. Gieseg, SP, Esterbauer, H: Low-density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Lett.* 1994, **343**, S. 188-194
60. Gil, F, Gonzalvo, MC, Pla, A, et al.: Differences in the kinetic properties, effect of Ca²⁺ and sensitivity to inhibitors of paraoxon hydrolase activity in rat plasma and microsomal fraction from rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 1994, **48/8**, S. 1559-1568
61. Goetzl, EJ, An, S: Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J.* 1998, **12**, S. 1589-1598
62. Gordon, DJ, Probstfield, JL, Garrison, RJ, et al.: High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease - four prospective American studies. *Circulation* 1989, **79**, S. 8-15
63. Gotto, AM, Pownall, HJ, Havel, RJ: Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1986, **128**, S. 3-41
64. Gray, JA, Roth, BL, A last GASP for GPCRs? *Science* 7/2002, **297**, S. 529-530
65. Gueguen, G, Gaigé, B, Chap, H, et al.: Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry* 1999, **38**, S. 8440-8450
66. Guo, Z, Liliom, K, Tigyi, G, et al.: Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 12/1996, **93**, S. 14367-14372
67. Guyton, JR, Klemp, KF: Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, **16**, S. 4-11

68. 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 of LPA receptors. *FEBS Letters* 2002, **523**, S. 187-192
69. Hantgan, RR: A study of the kinetics of the ADP-triggered platelet shape change. *Blood* 1984, **64**, S. 896-906
70. Haunsdorff, W, Caron, MG, Lefkowitz, RJ: Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 1990, **4**, S. 2881-2889
71. Hecht, JH, Weiner, JA, Post, SR, Chun, J: Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J. Cell Biol.* 11/1996, **135/4**, S. 1071-1083
72. Heery, JM, Kozak, M, Prescott, SM, et al.: Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 11/1995, **96**, S. 2322-2330
73. Hess, HH, Derr, JE: Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0,1-5 nanomolar range. *Anal. Biochem.* 1975, **63**, S. 607-613
74. Hla, T, Lee, MJ, Ancellin, N, et al. Lysophospholipids - receptor revelations. *Science* 11/2001, **294**, S. 1875-1878
75. Hla, T, Maciag, T: An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, S. 9308-9313
76. Hodis, HN, Kramsch, DM, Avogaro, P et al., Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J. Lipid Res.* 1994, **35/4**, S. 669-677
77. Holvoet, P, Vanhaecke, J, Janssens, S, et al., Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 1998, **98**, S. 1487-1494
78. Huber, K, Andreesen, R: Hemmung der Thrombozytenaggregation als therapeutisches Prinzip. *Internist* 2000 [Suppl. 1], **41**, S. S34-S39
79. Jalink, K, Hengeveld, T, Moolenaar, WH, et al.: Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis. *Biochem. J.* 1995, **307**, S. 609-616
80. Kaluzny, MA, Duncan, LA, Merritt, MV, Epps, DE: Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.* 1985, **26**, S. 135-140
81. Knopp, RH: Medikamentöse Behandlung von Fettstoffwechselstörungen. *N. Engl. J. Med.* 8/1999, **341**, S. 498-511
82. Koch, K: MONICA-Projekt. *Deutsches Ärzteblatt*, 3/2000, **97/10**, S. C-467f
83. Lefkowitz, RJ: G Protein-coupled receptor kinases. *Cell* 8/1993, **74**, S. 409-412
84. van Lenten, BJ, Hama, SY, de Beer, FC, et al.: Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. *J. Clin. Invest.* 1995, **96**, S. 2758-2767
85. 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**, S. 616-623

86. Liliom, K, Murakami-Murofushi, K, Tigyi, G: Xenopus oocytes express multiple receptors for LPA-like lipid mediators. *Am. J. Physiol.* 1996, **270 (Cell Physiol. 39)**, S. C772-C777
87. Lynch, KR, Im, DS: Life on the edge. *TIPS* 10/1999, **20**, S. 473-475
88. Lynch, SM, Frei, B: Mechanisms of copper- and iron-dependent oxidative modification of human low-density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 1993, **34**, S. 1745-1753
89. Lynch, SM, Frei, B: Reduction of copper, but not iron, by human low-density lipoprotein (LDL). *J. Biol. Chem.* 3/1995, **270/10**, S. 5158-5163
90. Mackness, MI, Arrol, S, Abbott, C, Durrington, PN: Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993, **104**, 129-135
91. Mackness, MI, Durrington, PN: HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis* 1995, **115**, S. 243-253
92. Mahley, RW: Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 4/1988, **240**, S. 622-630
93. Markwell, MAK, 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**, S. 206-210
94. Maschberger, P, Bauer, M, Siess, W, et al.: Mildly oxidized LDL stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor rapidly Src-family and Syk tyrosine kinases, and Ca^{2+} -influx in human platelets. *J. Biol. Chem.* 6/2000, **275/25**, S. 19159-19166
95. Mauco, G, Chap, H, Simon, MF, Douste-Blazy, L: Phosphatidic- and lysophosphatidic acid production in phospholipase C- and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie* 1978, **60**, S. 653-661
96. Meraji, S, Moore, CE, Skinner, VO, Bruckdorfer, KR: The importance of oxidation or glycosylation of low-density lipoproteins in relation to platelet activation. *Platelets* 1992, **3**, S. 155-162
97. Meyer, DF, Nealis, AS, Perkins, SJ, et al.: Time-course studies by synchrotron x-ray solution scattering of the structure of human low-density lipoprotein during Cu^{2+} induced oxidation in relation to lipid composition. *Biochem J.* 1996, **319**, S. 217-227
98. Miller, NE: Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am. Heart J.* 2/1987, **113/2/2**, S. 589-597
99. Miller, NE, LaVille, A, Crook, D: Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high-density lipoprotein in rabbit. *Nature* 3/1985, **314**, S. 109-111
100. Moolenaar, WH: Bioactive lysophospholipids and their G Protein-coupled receptors. *Exp. Cell Res.* 1999, **253**, S. 230-238
101. Moolenaar, WH: Lysophosphatidic Acid, a Multifunctional Phospholipid Messenger. *J. Biol. Chem.* 6/1995, **270/22**, S. 12949-12952
102. Moolenaar, WH, Lysophospholipids in the limelight: autotaxin takes center stage. *J. Cell Biol.* 7/2002, **158/2**, S. 197-199

103. Moolenaar, WH, Kranenburg, O, Postma, FR, Zondag, GCM: Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, **9**, S. 168-173
104. Moore, S, Friedman, RJ, Singal, DP, et al.: Inhibition of injury-induced thromboatherosclerotic lesions by anti-platelet serum in rabbits. *Thromb. Haemostas.* 1976, **35**, S. 70-81
105. Motohashi, K, Shibata, S, Igarashi, Y, et al.: Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FEBS Letters* 2000, **468**, S. 189-193
106. Negrescu, EV, Lubert de Quintana, K, Siess, W: Platelet shape change induced by thrombin receptor activation. *J. Biological Chemistry* 1995, **270/3**, S. 1057-1061
107. Nietgen, GW, Chan, CK, Durieux, ME: Inhibition of lysophosphatidate signaling by lidocaine and bupivacaine. *Anesthesiology* 5/1997, **86**, S. 1112-1119
108. van Nieuw Amerongen, GP, Vermeer, MA, van Hinsbergh, VWM et al., Simvastatin improves disturbed endothelial barrier function. *Circulation* 2000, **102**, S. 2803-2809
109. Noble, RP: Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J. Lipid Res.* 1968, **9**, S. 693-700
110. Ohta, T, Takata, K, Horiuchi, S, et al.: Protective effect of lipoproteins containing apoprotein A-I on Cu²⁺-catalyzed oxidation of human low-density lipoprotein. *FEBS Letters* 11/1989, **257/2**, S. 435-438
111. Packard, CJ, O'Reilly, DSJ, Caslake, MJ et al., Lipoprotein-associated Phospholipase A₂ as an independent predictor of coronary heart disease. *New Engl. J. Med* 10/2000, **343**, S. 1148-1155
112. Pieters, MN, Schouten, D, van Berkel, TJC: In vitro and in vivo evidence for the role of HDL in reverse cholesterol transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, **1225**, S. 125-134
113. Postma, FR, Jalink, K, Moolenaar, WH, et al.: Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G Protein-coupled LPA receptor. *EMBO J.* 1996, **15/1**, S. 63-72
114. Rajavashisth, TB, Andalibi, A, Territo, MC, et al.: Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 3/1990, **344**, S. 254-257
115. Retzer, M, Essler, M, Lysophosphatidic acid-induced platelet shape change proceeds via Rho/Rho kinase-mediated myosin light-chain and moesin phosphorylation. *Cellular Signalling* 2000, **12**, S. 645-648
116. Ross, R: Cell Biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1995, **57**, S. 791-804
117. Ross, R: Platelet-derived growth factor. *Lancet* 5/1989, **1(8648)**, S. 1179-1182
118. Ross, R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 4/1993, **362**, S. 801-809
119. Salonen, JT, Nyssönen, K, Salonen, R, et al.: Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* 1997, **95**, S. 840-845
120. Salonen, JT, Ylä-Herttuala, S, Witztum, JL, et al.: Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 4/1992, **339**, S. 883-887

121. Sartor, O, McLellan, CA, Myers, CE, Borner, MM: Suramin rapidly alters cellular tyrosine phosphorylation in prostate cancer cell lines. *J. Clin. Invest.* 1992, **90**, S. 2166-2174
122. Schömig, A, Neumann, FJ, Kastrati, A, et al., A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary artery stents. *N. Engl. J. Med.* 4/1996, **334/17**, S. 1084-1090
123. Schulz, T, Schiffl, H, Lorenz, R, et al.: Preserved antioxidative defense of lipoproteins in renal failure and during hemodialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 4/1995, **25/4**, S. 564-571
124. Schumacher, KA, Classen, HG, Späth, M: Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives: identity with substances in aged serum (DAS). *Thrombos. Haemostas.* 1979, **42**, S. 631- 640
125. Schumaker, VN, Puppione, DL: Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol.* 1986, **128**, S. 155-171
126. Seufferlein, T, Rozengurt, E: Lysophosphatidic acid stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin, and p130. *J. Biol. Chem.* 3/1994, **269/12**, S. 9345-9351
127. Sevanian, A, Bittolo-Bon, G, Cazzolato, G, et al., LDL— is a lipid hydroperoxide-enriched circulating lipoprotein. *J. Lipid Res.* 1997, **38**, S. 419-428
128. Sevitt, S: Platelets and foam cells in the evolution of atherosclerosis – histological and immunohistological studies of human lesions. *Atherosclerosis* 1986, **61**, S. 107-115
129. Shaikh, NA: Assessment of various techniques for the quantitative extraction of lysophospholipids from myocardial tissues. *Anal. Biochem.* 1994, **216**, S. 313-321
130. Shih, DM, Gu, L, Lusis, AJ, et al.: Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 7/1998, **394**, S. 284-287
131. Shimano, H, Yamada, Y, Ishibashi, S, et al.: Oxidation-labile subfraction of human plasma low density lipoprotein isolated by ion-exchange chromatography. *J. Lipid Res.* 1991, **32**, S. 763-773
132. Siess, W, Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, **1582**, S. 204-215
133. Siess, W: Molecular Mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev.* 1/1989, **69**, S. 58-178
134. Siess, W: Platelets in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990, **273**, S. 119-127
135. Siess, W, Essler, M, Brandl, R: Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate: two lipid villains provoking cardiovascular diseases? *IUBMB Life* 2000, **49**, S. 167-171
136. Siess, W, Lapetina, EG: Functional relationship between cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and platelet inhibition. *Biochem. J.* 1990, **271**, S. 815-819
137. Siess, W, Zangl, KJ, Essler, M, et al.: Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly-oxidized LDL and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**, S. 6931-6936
138. Silverman, DI, Ginsburg, GS, Pasternak, RC: High-density lipoprotein subfractions. *Am. J. Med.* 1993, **94**, S. 636-645

139. Simeon, V, Pavkovic, E: Heat inactivation of paraoxonase and arylesterase activities in human and rabbit serum. *Chem.-Biol. Interact.* 1993, **87**, S. 103-107
140. Simon, MF, Chap, H, Douste-Blazy, L: Human platelet aggregation induced by 1-alkyllysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators? *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10/1982, **108/4**, S. 1743-1750
141. Smith, C, Mitchinson, MJ, Aruoma, OI, Halliwell, B: Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem. J.* 1992, **286**, S. 901-905
142. Stafforini, DM, Prescott, SM, McIntyre, TM, Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Biol. Chem.* 3/1987, **262**, S. 4223-4230
143. Stampfer, MJ, Sacks, FM, Salvini, S, et al.: A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 8/1991, **325/6**, S. 373-381
144. Staprāns, I, Rapp, JH, Pan, XM, et al.: Oxidized lipids in the diet accelerate the development of fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, **16**, S. 533-538
145. Steinberg, D, Parthasarathy, S, Carew, TE, et al.: Beyond cholesterol – modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 4/1989, **320/14**, S. 915-924
146. Steinberg, D, Witztum, JL: Lipoproteins and atherogenesis. *JAMA* 12/1990, **264/23**, S. 3047-3052
147. Steinbrecher, UP, Pritchard, PH: Hydrolysis of phosphatidylcholine during LDL oxidation is mediated by platelet-activating factor acetylhydrolase. *J. Lip. Res.* 1989, **30**, S. 305-315
148. Stremmler, KE, Stafforini, DM, Prescott, et al.: An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J. Biol. Chem.* 1989, **264/10**, S. 5331-5334
149. Sugiura, T, Tokumura, A, Hanahan, DJ: Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: comparison with platelet activating factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 6/1994, **311/2**, S. 358-368
150. Svetlov, SI, Siafaka-Kapadai, A, Hanahan, DJ, Olson, MS: Signaling responses to alkyllysophosphatidic acid: The activation of phospholipases A₂ and C and protein tyrosine phosphorylation in human platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 12/1996, **336/1**, S. 59-68
151. Takahashi, Y, Chiba, H, Matsuno, K, et al.: Native lipoproteins inhibit platelet activation induced by oxidized lipoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996, **222**, S. 453-459
152. Tew, DG, Southan, C, Macphee, CH, et al., Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, **16**, S. 591-599
153. Thaulow, E, Erikssen, J, Sandvik, L, et al.: Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* 1991, **84**, S. 613-617

154. Thomson, FJ, Perkins, L, Ahern, D, Clark, M: Identification and characterization of a lysophosphatidic acid receptor. *Molecular Pharmacology* 1994, **45**, S. 718-723
155. 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.* 10/1992, **267/30**, S. 21360-21367
156. Tjoelker, LW, Prescott, SM, Gray, PW, et al.: Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 4/1995, **374**, S. 549-553
157. Tokumura, A, Fukuzawa, K, Isobe, J, Tsukatani, H: Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 3/1981, **99/2**, S. 391-398
158. Tokumura, A, Harada, K, Yoshioka, Y, et al.: Analyses of lysophosphatidic acids by gas chromatography mass spectrometry without hydrolytic pretreatment. *Biomed. Mass Spectr.* 1984, **11/4**, S. 167-171
159. Topol, EJ: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease - Clinical perspectives. *Eur. Heart J.* 1996, **17**, S. 9-18
160. Tribble, DL, Chu, BM, Levine, GA, et al.: Selective resistance of LDL core lipids to iron-mediated oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, **16**, 1580-1587
161. Tselepis, AD, Dantan, C, Ninio, E, et al.: PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, **15**, S. 1764-1773
162. Virchow, R: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. *Verlag August Hirschwald*, Berlin 1858 - Reprint der Georg Olms Verlagsbuchhandlung, Hildesheim 1966
163. Wallentin, L, Sundin, B: HDL₂ and HDL₃ lipid levels in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1985, **59**, S. 131-136
164. Watson, AD, Berliner, JA, Hama, SY, et al.: Protective effect of high-density lipoprotein associated paraoxonase. *J. Clin. Invest.* 12/1995, **96**, S. 2882-2891
165. Watson, AD, Leitinger, N, Navab, M, et al.: Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low-density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J. Biol. Chem.* 5/1997, **272/21**, S. 13597-13607
166. Watson, AD, Navab, M, Hama, SY, et al.: Effect of platelet-activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low-density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 12/1995, **95**, S. 774-782
167. Watson, SP, McConnell, RT, Lapetina, EG: Decanoyl lysophosphatidic acid induces platelet aggregation through an extracellular action - Evidence against a second messenger role for lysophosphatidic acid. *Biochem. J.* 1985, **232**, S. 61-66
168. Weidtmann, A, Scheithe, N, Hrboticky, N, Pietsch, A, Lorenz, R, Siess, W: Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A₂. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, **15**, S. 1131-1138

169. Weiss, EJ, Bray, PF, Taybach, M, et al.: A Polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N. Engl. J. Med.* 4/1996, **334/17**, S. 1090-1094
170. Witztum, JL, Steinberg, D: Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 12/1991, **88**, S. 1785-1792
171. Wood, D: European and American recommendations for coronary heart disease prevention. *Europ. Heart J.* 1998, **19** [Suppl. A], S. A12-A19
172. Yang, AH, Ishii, I, Chun, J, In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, **1582**, S. 197-203
173. Yang, L, Yatomi, Y, Hisano, N, et al.: Activation of protein-tyrosine kinase syk in human platelets stimulated with lysophosphatidic acid or sphingosine 1-phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996, **229**, S. 440-444
174. Ylä-Herttuala, S, Palinski, W, Witztum, JL, et al.: Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J. Clin. Invest.* 10/1989, **84**, S. 1086-1095
175. van Zanten, GH, de Graaf, S, Slootweg, PJ, et al.: Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J. Clin. Invest.* 2/1994, **93**, S. 615-632
176. Ziouzenkova, O, Giseg, SP, Ramos, P, Esterbauer, H: Factors affecting resistance of low-density lipoproteins to oxidation. *Lipids* 1996, **31-suppl.**, S. 71-76

Wer aber ist ein solcher literarischer Vielfraß,
daß er alles, was auf den Markt kommt,
zur Kenntnis nehmen könnte.

Robert Burton, posthum 1651

Anhang

Publikationsliste

Folgende Teile dieser Arbeit wurden mit Genehmigung vorab veröffentlicht:

Originalarbeiten:

1. Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. und Aepfelbacher, M.: Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly-oxidized LDL and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**, S. 6931-6936
2. Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Zangl, K.J., Tigyi, G., und Siess, W.: Stimulation of platelets and endothelial cells by mildly-oxidized LDL proceeds through activation of lysophosphatidic acid receptors and the Rho/Rho-kinase pathway - Inhibition by lovastatin. *Ann. NY Acad. Sci.* 2000/4, **905**, S. 282-286
3. Maschberger, P., Bauer, M., Baumann-Siemons, J., Zangl, K.J., Negrescu, E.V., Reininger, A.V. und Siess, W.: Mildly oxidized LDL stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor rapidly Src-family and Syk tyrosine kinases, and Ca^{2+} -influx in human platelets. *J Biol. Chem.* 2000/6, **275/25**, S. 19159-19166

Kongreßbeitrag:

Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Zangl, K.J., Tigyi, G., und Siess, W.: Stimulation of platelets and endothelial cells by mildly-oxidized LDL proceeds through activation of lysophosphatidic acid receptors and the Rho/Rho-kinase pathway - Inhibition by lovastatin.
Poster. New York Academy of Sciences Conference on lysophospholipids and eicosanoids in cancer and in cardiovascular and neurodegenerative disease, New York, 25.-28.06.1999.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Siess danke ich recht herzlich für Anregung, Hilfe und Betreuung während der gesamten Arbeit von der Erstellung des Themas bis zur abschließenden Korrektur. Besonderen Dank schulde ich für die zahlreichen Diskussionen, sowie die Bereitschaft, neue Wege in der Realisierung eigener Ideen einzuschlagen. Darüber hinaus verdanke ich ihm freundliche Unterstützung bei der Publikation der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. med. P. C. Weber danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und verschiedenste Tips und Ratschläge.

Nebst zahlreichen anderen Institutsmitarbeitern gilt mein besonderer Dank Frau C. Corrinth für die Einarbeitung in die Methodik und zahlreiche Erörterungen zur komplexen Thematik, Herrn M. Bauer für seine weiterführenden Untersuchungen zur Signalverarbeitung sowie seine Hilfestellungen in den Bereichen EDV und Präsentation, Frau P. Maschberger für die Erstellung der initialen Western-Blots und Herrn Dr. med. M. Essler für die Bereitstellung der ersten LPA-Chargen.

Darüber hinaus danke ich den Assistentinnen Frau C. Meister und Frau U. Wielert für ihre tatkräftige Hilfe und gute Zusammenarbeit, insbesondere während der sequentiellen Lipidextraktionen, sowie Frau B. Zimmer für zahlreiche Cholesterinmessungen und Begleitanalysen.

Herrn Dr. A. J. Reiningher des Instituts für Anatomie der TU München möchte ich für die Erstellung der rasterelektronenmikroskopischen Bilder danken, und ebenso den Herren R. Bittmann, M.D., vom Queens College, New York, sowie G. Tigyi, M.D., von der University of Tennessee, Memphis, für die Bereitstellung der LPA-Rezeptorantagonisten NPTyrPA und NP SerPA.

Lebenslauf

Konrad Josef Zangl
Neulandstraße 29
85354 Freising

geboren am 23. März 1973 in Freising

Schulbildung: Sept. 1979 bis Juli 1983: Volksschule Freising-Vötting
Sept. 1983 bis Juli 1992: Dom-Gymnasium Freising
Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife

Studium: Okt. 1992 bis Okt. 1994
Vorklinischer Ausbildungsabschnitt für Humanmedizin
an der Universität Regensburg

Okt. 1994 bis Mai 1999
Klinischer Ausbildungsabschnitt für Humanmedizin am Klinikum
Rechts der Isar der Technischen Universität München
Abschluß mit der Ärztlichen Prüfung

Promotion: Seit März 1996
Erstellung der vorliegenden Promotionsarbeit bei Prof. Dr. med. W. Siess
am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislauferkrankungen
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinische Tätigkeit: Juli 1999 bis Dezember 2000
AiP in der I. Medizinischen Abteilung (Schwerpunkt Kardiologie)
des Lehrkrankenhauses München-Pasing