

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

**Lysophospholipide als Modulatoren proinflammatorischer und thrombogener Signal-
wege in humanen Endothelzellen und Thrombozyten**

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

Vorgelegt von

Michaela Retzer-Lidl

aus

München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter C. Weber

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert
Prof. Dr. B. Engelmann
Prof. Dr. R. Wank

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Markus Essler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 06. 2002

Meinen Eltern

und

Manfred

Abkürzungen

HUVEC	“human umbilical vein endothelial cells“ = venöse Endothelzellen aus menschlichen Nabelschnüren
LDL	“low density lipoprotein“ = Lipoprotein niedriger Dichte
Mox-LDL	milde oxidiertes LDL
LPA	“lysophosphatidic acid“ = Lysophosphatidsäure
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
MLC = MLK	“myosin light chain“ = Myosin Leicht Kette
MLCK = MLKK	“myosin light chain kinase“ = Myosin Leicht Ketten Kinase
MLC-Pase = MLK-Pase	“myosin light chain phosphatase“ = Myosin Leicht Ketten Phosphatase
EDG	“endothelial differentiation gene“
Rho-GTP	GTP-gebundenes Rho
Rho-GDP	GDP-gebundenes Rho
MAPK	“mitogen activated protein kinase“ = Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK = MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MEKK	MEK Kinase
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase
SRF	Serum responsibler Faktor
PAK	p21 aktivierte Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
SAPK	streßaktivierte Proteinkinase
PDGF	“platelet derived growth factor“ = Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
EGF	“epidermal growth factor“ = epidermaler Wachstumsfaktor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung-Stand der Forschung	1
1.1.	Die “response to injury“-Hypothese der Arteriosklerose-Entstehung	1
1.2.	Endothelfunktion und Dysfunktion	3
1.2.1.	Regulation der Permeabilität	3
1.2.2.	Regulation der Leukozyten-Adhäsion und –Transmigration	5
1.2.3.	Regulation der Hämostase	6
1.2.4.	Regulation der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur und der Thrombozytenaktivierung	6
1.3.	Thrombozyten und Arteriosklerose	7
1.4.	Milde oxidiertes LDL (mox-LDL)	8
1.5.	Die Lysophospholipide Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P)	11
1.5.1.	Bildung und Abbau von LPA und S1P	12
1.5.2.	Zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide	13
1.5.2.1.	Regulation der Zellmorphologie	
1.5.2.2.	Regulation des Zellwachstums	
1.5.3.	Lysophospholipid-Rezeptoren	15
1.5.4.	Durch Lysophospholipide aktivierte Signalwege	16
1.5.5.	Pathophysiologische Bedeutung von LPA und S1P	18
1.5.5.1.	Angiogenese und Vaskulogenese/Organentwicklung	
1.5.5.2.	Thrombozytenaktivierung	
1.5.5.3.	Entzündungsreaktionen	
1.5.5.4.	Wundheilung	
1.5.5.5.	Tumorausbreitung	
1.5.5.6.	Hirnschrankenpermeabilität	

1.6.	Die Rho-Familie der kleinen GTPasen	21
1.6.1.	Rho und seine Funktionen	21
1.6.1.1.	Permeabilität	
1.6.1.2.	Motilität und und Migration	
1.6.1.3.	Apoptose	
1.6.1.4.	Aktinzytoskelett	
1.6.1.5.	Gentranskription, Proliferation und Zellzyklus	
1.6.1.6.	Thrombozytenaktivierung	
1.6.2.	Rac und seine Funktionen	26
1.6.2.1.	Aktinzytoskelett	
1.6.2.2.	Motilität und Migration	
1.6.2.3.	Neurogenese und Myogenese	
1.6.2.4.	Regulation der NADPH Oxidase	
1.6.2.5.	Gentranskription	
1.6.3.	Regulation der GTPase-Aktivität der Rho GTPasen	29
1.6.4.	Aktivierung der Rho GTPasen	30
1.6.5.	Effektorproteine der Rho GTPasen	33
1.6.6.	Strategien zur Rho- und Rho-Kinase-Hemmung	35
1.6.6.1.	Rho-Hemmung durch C3-Transferase aus <i>Clostridium botulinum</i>	
1.6.6.2.	Rho-Kinase-Hemmung durch Y-27632	
2.	Zielsetzung und Fragestellung	37
3.	Material	40
3.1.	Substanzen allgemein	40
3.2.	Spezielle Substanzen, Verbrauchsmittel und Geräte für:	40
3.2.1.	Endothelzellkultur	40
3.2.2.	Isolierung menschlicher Thrombozyten und Messung des ‘shape change‘	40
3.2.3.	Immunfluoreszenz	40

3.2.4.	Mikroinjektion	41
3.2.5.	Myosin Leicht Ketten-Phosphorylierung	41
3.2.6.	Moësin-Phosphorylierung in Thrombozyten	43
3.2.7.	Präparation myosinreicher Endothelzellfraktionen	43
3.2.8.	Messung der Myosin Phosphatase-Aktivität	44
3.2.9.	Messung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration	44
3.2.10.	Messung der endothelialen Permeabilität	44
3.2.11.	Messung der Rac-Aktivität (Rac ‘pull-down assay‘)	44
4.	Methoden	45
4.1.	Präparation von milde oxidiertem LDL	45
4.2.	Endothelzellkultur	45
4.3.	Isolierung menschlicher Thrombozyten und Messung des ‘shape change‘	45
4.4.	Immunfluoreszenz	46
4.5.	Mikroinjektion	46
4.6.	Myosin Leicht Ketten-Phosphorylierung	46
4.6.1.	Probengewinnung	
4.6.2.	SDS-PAGE	
4.6.3.	Westernblot	
4.7.	Moësin-Phosphorylierung in Thrombozyten	48
4.8.	Präparation myosinreicher Endothelzellfraktionen	48
4.9.	Messung der Myosin Phosphatase-Aktivität	48
4.10.	Messung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration	49
4.11.	Messung der endothelialen Permeabilität anhand des Meerrettichperoxidase-Assays	49
4.12.	Messung der Rac-Aktivität (Rac ‘pull-down assay‘)	49

5.	Ergebnisse	51
5.1.	Ergebnisauswertung der Experimente mit Endothelzellen	51
5.1.1.	Erhöhung der endothelialen Permeabilität über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus durch mox-LDL	51
5.1.2.	Vergleich der morphologischen Veränderungen nach Stimulation mit mox-LDL, LPA und S1P im Zeitverlauf	53
5.1.3.	Endothelzellkontraktion und Aktinstreißfaserbildung sind Rho/Rho-Kinase abhängig, die Bildung der “membrane ruffles“ ist Rho/Rho-Kinase unabhängig	55
5.1.4.	Bildung der durch S1P induzierten “membrane ruffles“ durch Aktivierung von Rac	58
5.1.4.1.	Mikroinjektion von dominant negativem N17Rac hemmt die durch S1P induzierte Bildung der “membrane ruffles“	
5.1.4.2.	Durch S1P aktiviertes Rac transloziert nach 1-2minütiger Stimulation aus dem Zytosol an die peripheren Membranen	
5.1.4.3.	Erhöhung der Rac-Aktivität im Rac pulldown assay nach 1-2minütiger Stimulation mit S1P	
5.1.5.	“Downregulation“ der MLC -Phosphatase zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch mox-LDL, LPA und S1P	62
5.1.6.	Steigerung der MLC-Phosphorylierung über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch mox-LDL, LPA und S1P	64
5.1.7.	Einbau der phosphorylierten Myosin Leicht Kette in Aktinstreißfasern durch mox-LDL	67
5.2.	Ergebnisauswertung der Experimente mit Thrombozyten	69
5.2.1.	Mox-LDL und LPA induzieren über einen Rho-Kinase abhängigen Mechanismus den “shape change“ der Thrombozyten	69

5.2.2.	Steigerung der MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase durch mox-LDL und LPA	71
5.2.3.	Steigerung der Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase durch mox-LDL und LPA	75
5.2.4.	Keine Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in Thrombozyten durch mox-LDL oder LPA	80
6.	Diskussion	82
7.	Zusammenfassung	91
8.	Literatur	92

1. Einleitung-Stand der Forschung

1.1. Die ‘response to injury‘ -Hypothese der Arteriosklerose-Entstehung

Erkrankungen von Herz und Kreislauf sind die häufigste Todesursache in den Industrienationen der westlichen Welt. Allein 50% aller Todesfälle in den USA, Europa und Japan lassen sich auf Arteriosklerose zurückführen.

Unter Arteriosklerose versteht man eine Erkrankung der Intima der Arterienwand, die vor allem die Koronararterien und die Arterien des Gehirns sowie die Bauchaorta mit den Nierenarterien und den Gefäßen der unteren Extremitäten betrifft. Im Rahmen eines entzündlich-proliferativen Prozesses entwickelt sich eine Verhärtung (griech. skleros hart) und Verdickung der Arterienwand. Es resultiert eine Lichtungseinengung, wodurch der Blutfluß an der entsprechenden Stelle behindert wird. Kommt es zum Verschuß des Gefäßes, können gefährliche Ereignisse wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder Gangrän der unteren Extremität die Folge sein.

Die Bezeichnung Atheroklerose wird ebenfalls verwendet, insbesondere wenn „atheromartige“ Fettablagerungen vorliegen.

Nach der WHO-Definition von 1958 ist die Arteriosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Intima der Arterien, bestehend aus einer fokalen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut- und Blutbestandteilen, fibrösem Gewebe und Kalziumablagerungen, kombiniert mit Mediaveränderungen.

Die Ätiologie der Arteriosklerose ist unklar, eigentlich kennt man nur Risikofaktoren, keine wirklichen Kausalfaktoren (Vgl. Tab. 1).

<u>Unbeeinflussbare Risikofaktoren:</u>	
Familiäre Disposition Lebensalter Männliches Geschlecht	
<u>Beeinflussbare Risikofaktoren:</u>	
<u>1. Ordnung:</u>	<u>2. Ordnung:</u>
Fettstoffwechselstörungen: erhöhtes LDL oder erniedrigtes HDL Hyperfibrinogenämie Nikotinabusus arterielle Hypertonie Diabetes mellitus	Adipositas Bewegungsmangel Emotioneller Streß und sog. Typ A- Persönlichkeitsstruktur

Tab. 1: Risikofaktoren der Arteriosklerose (nach der Framingham-Studie)

Die Theorie, die die Ätiologie der Arteriosklerose momentan am ehesten kausal beschreibt, ist die "response to injury"-Hypothese nach Ross (Ross, 1999). Demnach ist das entscheidende Ereignis, das zur Entstehung der Arteriosklerose führt, der Verlust der Integrität des Endothels im Sinne einer Endothel-Dysfunktion. Diese Endothelschädigung, die bevorzugt an und gegenüber von Gefäßabzweigungen, wo sowohl turbulente Strömungen als auch eine Stase des Blutstroms vorhanden sind, auftritt, wird vor allem durch Toxine, Chlamydien, oxidiertes LDL und freie Radikale verursacht.

Chlamydien, die zu den intrazellulär lebenden Mikroorganismen gehören, können sowohl Immunzellen, wie T-Zellen, Monozyten und Makrophagen, als auch Nicht-Immunzellen, wie Endothelzellen und glatte Muskelzellen infizieren. Die Infektion der Endothelzellen führt in den Endothelzellen zur Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Das Zusammenspiel dieser inflammatorischen Mediatoren wiederum bewirkt eine chronische Entzündungsreaktion, welche sich auch in einer Endothel-Dysfunktion ausdrückt (Summersgill et al., 2000, Mahony und Coombes, 2001).

Bei der Hyperlipoproteinämie führt der erhöhte Plasmaspiegel an "Low Density Lipoproteinen" (LDL) zur vermehrten Ablagerung von LDL im subendothelialen Raum (Goldstein und Brown, 1977; Steinberg, 1983). Dabei wird ein Teil durch Sauerstoffradikale, die von aktivierten Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und glatten Muskelzellen freigesetzt werden, oxidiert (Cathcart et al., 1985; Hiramatsu et al., 1987; Morel et al., 1984; Parthasarathy et al., 1986). Oxidiertes LDL induziert eine endotheliale Dysfunktion, indem es chemotaktisch

auf zirkulierende Monozyten wirkt, ihre Adhärenz ans Endothel und ihre Penetration in den subendothelialen Raum, fördert. Außerdem soll oxidiertes LDL die Permeabilität des Endothels für Proteine einschließlich LDL erhöhen, wodurch wiederum die Integrität des Endothels gestört wird. Über welchen Mechanismus oxidiertes LDL zur endothelialen Dysfunktion führt war und ist Gegenstand der Forschung und soll in dieser Arbeit unter anderem näher beleuchtet werden.

Um die Entstehung der Arteriosklerose - ausgehend von der endothelialen Dysfunktion - besser zu verstehen, werden im Folgenden die Eigenschaften und Funktionen des Endothels beschrieben.

1.2. Endothelfunktion und Dysfunktion

Das Endothel kleidet als einlagige Zellschicht das Lumen der Gefäße aus. Es bildet eine physikalische Grenze zwischen Blut und umgebendem Gewebe und reguliert den Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten. Die Endothelzellen wachsen als Monolayer und weisen eine geringe Zellumsatzrate auf. Die gesamte Endothelfläche im Erwachsenen umfaßt ungefähr $1-7\text{m}^2$, besteht aus circa $1-6 \times 10^{13}$ Endothelzellen und wiegt etwa 1kg.

Das Endothel hat viele physiologische Funktionen (Cines et al., 1998; Toborek und Kaiser, 1999). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der

- Permeabilität,
- Leukozyten-Adhäsion und -Transmigration,
- Hämostase und
- Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur und Thrombozytenaktivierung.

1.2.1. Regulation der Permeabilität

Als Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und umgebendem Gewebe reguliert das Endothel den Austausch und aktiven Transport von Nährstoffen, Flüssigkeiten, Hormonen, Makromolekülen und Leukozyten zwischen beiden Kompartimenten (Stevens et al., 2000). Makromoleküle können das Endothel auf dreierlei Art passieren: parazellulär, zwischen den Zellen durch die Zwischen-Zell-Verbindungen oder durch Poren der Endothelzellen oder transzellulär über spezifische Rezeptoren (van Hinsbergh, 1997). Bei gestörter Barrierefunktion treten vermehrt Makromoleküle aus dem Blut durchs Endothel ins umgebende Gewebe. Die Permeabilität wird unter anderem durch vasoaktive Substanzen wie Thrombin (Essler et al., 1998)

oder Histamin erhöht (van Nieuw Amerongen et al., 1998). Nach V. W. M. van Hinsbergh führen Disintegration von Zwischen-Zell-Verbindungen ("tight junctions"; "adherens junctions") und Kontraktion von Endothelzellen, die mit dem Auftreten interzellulärer Lücken einhergeht, zur Permeabilitätserhöhung (van Hinsbergh, 1997). Der Mechanismus der Endothelzellkontraktion ist, wie in Abb. 1 dargestellt, mit dem in glatten Muskelzellen vergleichbar. Thrombin oder andere Stimuli führen zur vermehrten Phosphorylierung der Myosin Leicht Kette (MLK). Die dadurch bedingte Konformationsänderung der MLK bewirkt eine verstärkte Interaktion der MLK mit F-Aktinfilamenten, das Ineinandergleiten von Myosin- und Aktinfilamenten löst die Kontraktion aus. Zur vermehrten MLK-Phosphorylierung kommt es durch Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Myosin Leicht Ketten Kinase (MLKK), Aktivierung der Rho-Kinase oder Inaktivierung der MLK-Phosphatase. Die Inaktivierung der MLK-Phosphatase erfolgt über Aktivierung von Rho und Rho-Kinase, die die MLK-Phosphatase durch Phosphorylierung inaktiviert.

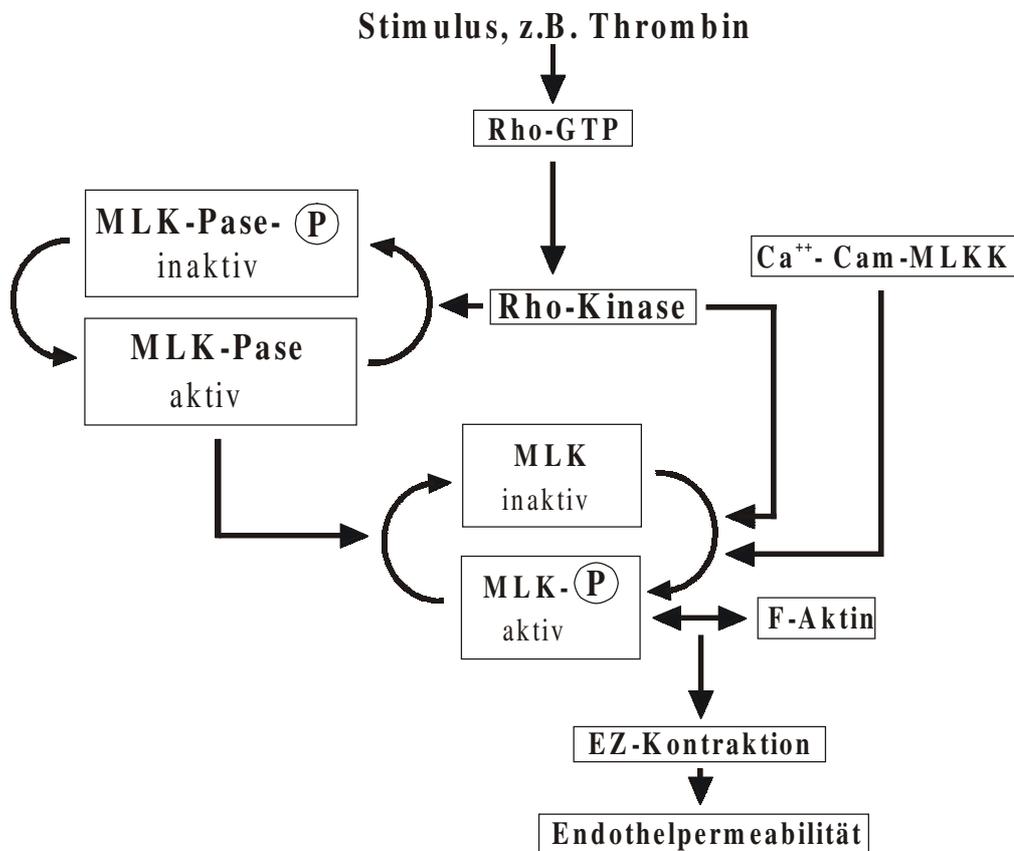


Abb.1: Mechanismus der Endothelzellkontraktion.

Rho-GTP, GTP-gebundenes Rho; MLK=MLC, Myosin Leicht Kette = ‘Myosin Light Chain‘; MLK -Pase = MLC-Pase, MLK-Phosphatase = ‘Myosin Light Chain Phosphatase‘; Ca⁺⁺-Cam-MLKK, Calcium-Calmodulin-Myosin Leicht Ketten Kinase

1.2.2. Regulation der Leukozyten-Adhäsion und -Transmigration

Es ist schon länger bekannt, daß bestimmte Leukozyten aus dem Blut an den Ort einer Entzündung wandern. Dabei werden sie durch spezielle körpereigene und bakterielle Stoffe ange lockt (Chemotaxis). Sie wandern in Richtung ansteigender Konzentrationen des chemotaktischen Stoffes, d. h. zum Infektions- oder Entzündungsort. Chemotaktisch wirksam sind u.a. einige Interleukine, Komplementfaktoren, Eikosanoide und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF). Um in das entzündete Gewebe zu gelangen, müssen die Leukozyten die Endothelbarriere passieren (Leukodiapedese). Die Leukodiapedese umfaßt das Rollen der Leukozyten auf dem Endothel, die Leukozyten-Adhäsion und Transmigration. Das Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen wird durch induzierbare Zelladhäsionsmoleküle, die auf Leukozyten und

Endothelzellen exprimiert werden, vermittelt. Dazu gehören vor allem E (Endothel), P (Plättchen) und L (Leukozyten)-Selektine (Ley, 1996). Nach Aktivierung leukozytärer Integrine (beta 2 Integrine) durch Chemokine kommt es zur Interaktion zwischen den beta 2 Integrinen und endothelialen Liganden wie Interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM). Dies führt zur Leukozytenadhäsion (Albelda et al., 1994). Danach erfolgt über beta 1 und beta 2 Integrine und über Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmoleküle (PECAM) die Transmigration (Weber et al., 1996, Weber et al., 1997).

1.2.3. Regulation der Hämostase

Eine weitere wichtige Rolle spielt das Endothel bei der Regulation der Hämostase (Becker et al., 2000). Ruhige Endothelzellen bilden eine antithrombotische Oberfläche, sie bilden und sezernieren fibrinolytische Faktoren wie zum Beispiel Gewebsplasminogen-Aktivator (t-PA). Weiterhin verhindern sie die Thrombozyten-Adhäsion und Aktivierung durch Bildung von Adenosin, NO und PGI₂. Sie hemmen außerdem die Thrombinwirkung durch Aktivierung von Antithrombin III und Aktivierung von Protein C via Thrombomodulin. Um diese komplexen Aufgaben wahrnehmen zu können, müssen Endothelzellen auf eine Vielzahl von endokrinen und parakrinen Reizen reagieren. Über spezifische Endothelzell-Rezeptoren wird die jeweilige Reaktion gesteuert.

Ist eine oder sind mehrere dieser Funktionen gestört, spricht man von einer Endothel-Dysfunktion. Sie tritt auf, wenn Endothelzellen durch bestimmte Substanzen aktiviert werden und sich daraufhin in ihrer Morphologie verändern. (Ruhige Endothelzellen werden von einem peripheren Ring aus Aktinfilamenten umgeben, im Zellkörper sind kaum Aktinstrukturen vorhanden. Bei Aktivierung der Zellen treten vermehrt Aktinstrukturen sogenannte Streßfasern im Zellinneren auf.) Die morphologische Veränderung drückt sich immer auch funktionell aus. So können beispielsweise nur ruhige, nicht aktivierte Endothelzellen eine antithrombotische Oberfläche bilden, die die Thrombusbildung verhindert.

1.2.4. Regulation der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur und der Thrombozytenaktivierung

Das intakte Endothel synthetisiert Substanzen (Pearson, 2000), die die Kontraktilität der Gefäßmuskulatur und das Verhalten der Thrombozyten beeinflussen. Dazu gehören Endothelin (ET) und Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), die man zu den Vasokonstriktoren rechnet, ferner ‘endothelium-derived relaxing factor‘ (EDRF), der kürzlich als NO identifiziert wurde

(Palmer et al., 1987), und Prostacyclin (PGI_2). NO hemmt die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten. Darüber hinaus reguliert NO den Gefäßtonus. Kürzlich wurde gezeigt, daß NO Mikrogefäße des Hamsters direkt, das heißt Ca^{2+} -unabhängig, erweitert, während EDHF (‘‘endothelium-dependent hyperpolarizing factor‘‘) über eine Absenkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Vasodilatation führt (Bolz et al., 1999). Prostacyclin bewirkt ebenfalls eine Vasodilatation und ist ferner der stärkste bekannte Thrombozyten-Aggregationshemmer. Es ist fraglich, ob eine Störung der genannten Regulationsmechanismen im Sinne einer endothelialen Dysfunktion ausreicht, um die Interaktion von Thrombozyten mit Zellen der Gefäßwand zu triggern (Ross, 1986). Gesichert ist dies jedoch für endotheliale Läsionen, die mit dem Verlust des Endothels und der Exposition subendothelialer Strukturen einhergehen. Wie die Thrombozyten in diesem Fall zur Entwicklung der Arteriosklerose beitragen, wird im Folgenden beschrieben.

1.3. Thrombozyten und Arteriosklerose

Wenn Thrombozyten durch physiologische Agonisten wie zum Beispiel Thrombin, Thromboxan-Analoga, ADP oder Kollagen aktiviert werden, tritt als erste Reaktion eine Formveränderung der Plättchen ein, der sogenannte ‘‘shape change‘‘. Diese Formveränderung beinhaltet die Abrundung und Kontraktion der Zellen, Faltung der Oberflächenmembran und Bildung von Pseudopodien. Sie geht der Aggregation und Sekretion voraus. Für den ‘‘shape change‘‘ von entscheidender Bedeutung ist die MLK-Phosphorylierung (Daniel et al., 1984). Die phosphorylierte MLK interagiert mit Aktinfilamenten und führt so zu Aktinzytoskelettveränderungen wie der Kontraktion. Von unserer Gruppe wurde kürzlich gezeigt, daß die MLK-Phosphorylierung und damit der ‘‘shape change‘‘ sowohl über einen Ca^{2+} -unabhängigen als auch über einen Ca^{2+} -abhängigen Signalweg ausgelöst werden kann (Bauer et al., 1999). So bewirken niedrig dosiertes Thrombin oder Thromboxan-Analoga über Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und Aktivierung von Rho-Kinase Ca^{2+} -unabhängig die MLK-Phosphorylierung und damit den ‘‘shape change‘‘. ADP und e in dem Kollagen ähnliches Peptid dagegen führen über Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Aktivierung der MLK-Kinase zur MLK-Phosphorylierung und somit zum ‘‘shape change‘‘. Normalerweise folgt dem ‘‘shape change‘‘ die Plättchenaggregation. Sie wird durch die Bindung von Fibrinogen an Fibrinogenrezeptoren in Anwesenheit von extrazellulären divalenten Kationen (Ca^{2+} oder Mg^{2+}) vermittelt. Man unterscheidet zwei Typen der Aggregation in vitro: primäre und sekundäre Aggregation. Bei der primären Aggregation kommt es nicht zur Freisetzung von Plättchen-Mediatoren. Sie ist daher reversibel. Die sekundäre Aggregation führt zur Sekretion

von Arachidonsäure und ADP, welche durch positiven Feedback-Mechanismus die Aggregation wiederum verstärken. Die sekundäre Aggregation ist daher irreversibel (Siess, 1989).

Thrombozyten wirken proarteriosklerotisch, indem sie mit Monozyten/Makrophagen interagieren und die Cholesterin-Aufnahme in monozytäre Zellen stimulieren. Dadurch fördern sie die Schaumzell-Bildung (Curtiss et al., 1987). Außerdem enthalten Thrombozyten in ihren α -Granula zahlreiche Mitogene, die sie im Rahmen der Aktivierung sezernieren können. Die wichtigsten sind PDGF ("platelet-derived growth factor"), der die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in die Intima stimuliert (Ross, 1989) und PD-ECGF ("platelet-derived endothelial cell growth factor"). Letzterer fördert Wachstum und Chemotaxis von Endothelzellen in vitro und zeigt angiogene Aktivität in vivo (Usuki et al., 1989). Neben der möglichen Beteiligung der Thrombozyten an der Ausbildung der frühen arteriosklerotischen Läsion kommt ihnen eine Schlüsselrolle im Spätstadium der Arteriosklerose zu. Wenn nämlich das Endothel über einer arteriosklerotischen Plaque durch Ulzeration, Plaqueruptur oder subintimale Blutung einreißt, werden Thrombozyten unmittelbar durch die freiliegenden subendothelialen Strukturen aktiviert (Siess, 1990). Dabei kommt es zur Bildung eines Thrombus. Dieser kann durch Anlagerung weiterer Thrombozyten sowie Erythrozyten an Größe zunehmen und dadurch zu einer hämodynamisch wirksamen Stenose oder zum vollständigen Verschluss des Gefäßes führen. Gefährliche Ereignisse wie Herzinfarkt oder Schlaganfall können die Folge sein. Die Entwicklung einer Thrombose auf dem Boden vorbestehender arteriosklerotischer Wandveränderungen der Gefäße ist damit das entscheidende Ereignis, das zur klinischen Manifestation der Arteriosklerose führt.

1.4. Milde oxidiertes LDL (mox-LDL)

Wie schon erwähnt, soll in dieser Arbeit unter anderem auf die Entstehung der endothelialen Dysfunktion durch milde oxidiertes LDL eingegangen werden.

Mox-LDL ist ein modifiziertes Lipoprotein. Lipoproteine sind hochmolekulare wasserlösliche Komplexe, die nach ihrer unterschiedlichen Dichte eingeteilt werden. Man unterscheidet "very low" (VLDL), "intermediate" (IDL), "low" (LDL) und "high (HDL) density lipoprotein". LDL entsteht aus VLDL und besteht zu 75% aus Lipiden und zu 25% aus Protein (Apoprotein B100). Um einen Kern aus Triglyzeriden und Cholesterinestern liegt ein "Monolayer" aus Phospholipiden. Darin sind freies Cholesterin und das in der Leber synthetisierte Apoprotein B100 eingebettet (Luley und Klör, 1993). Die im LDL-Partikel enthaltenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind durch zahlreiche natürlich vorkommende, lipophile Antioxidantien, wie

zum Beispiel Tocopherol und Carotin geschützt (Esterbauer et al., 1989). LDL dient dem Transport von Cholesterin von der Leber zu den peripheren Zellen. Etwa 70% des Serum-Gesamtcholesterins ist auf LDL verteilt.

Extrazelluläres nicht modifiziertes natives LDL wird durch LDL-Rezeptor-vermittelte Bindung des Apo B100 endozytotisch in Monozyten-Makrophagen aufgenommen. Anschließend wird durch intrazelluläre lysosomale Hydrolyse der LDL-Partikel Cholesterin freigesetzt. Die Synthese der LDL-Rezeptoren wird durch intrazelluläres Cholesterin in Form eines Rückkopplungsmechanismus über das auf dem LDL-Rezeptor-Gen befindliche "sterol regulatory element-1" (SRE-1) eng reguliert. Ein Mangel intrazellulären Cholesterins stimuliert mittels SRE-1 die Transkription des LDL-Rezeptors, eine Akkumulation intrazellulären Cholesterins dagegen hemmt die Transkription des LDL-Rezeptors (Goldstein und Brown, 1990).

Anders verhält sich die Aufnahme von modifiziertem LDL in Monozyten-Makrophagen. LDL kann beispielsweise durch Oxidation oder Acetylierung modifiziert werden. Oxidiertes LDL wird *in vivo* gebildet und ist an der Atherogenese beteiligt (Steinberg et al., 1989). Acetyliertes LDL wird ausschließlich *in vitro* erzeugt. Die Oxidation von LDL erfolgt *in vivo* durch die Vermittlung von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (Cathcart et al., 1985, Leake und Rankin, 1990, Morel et al., 1984) und wird durch Oxygenasen oder durch freie Radikale, wie Hypochlorit, Superoxidradikale oder Hydroxylradikale eingeleitet (Witztum, 1994). Dabei erfolgt eine Peroxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren des LDL-Partikels (Steinbrecher et al., 1984) und eine Abdeckung der ϵ -Aminogruppen des Apoproteins B100. An den freien ϵ -Aminogruppen des Apo B100 bilden sich daraufhin Konjugate mit Folgeprodukten des oxidativen Zerfalls der Fettsäuren, insbesondere mit Aldehyden. Diese Konjugate erhöhen die negative Ladung des oxLDL-Partikels. Auch bei der Acetylierung von LDL erhöht sich die negative Ladung des acLDL-Partikels, indem die ϵ -Aminogruppen des Apoproteins B100 acetyliert werden. Die erhöhte Elektronegativität des modifizierten LDL-Partikels verhindert die Bindung an den LDL-Rezeptor, erhöht jedoch seine Affinität für sogenannte "Scavenger-Rezeptoren" („Straßenfeger“- oder „Müllschlucker“-Rezeptoren), deren Klonierung vor einiger Zeit gelungen ist (Rohrer et al., 1990). Über diese "Scavenger-Rezeptoren" werden oxLDL ("Scavenger-Rezeptoren" Klasse A und CD36) und acLDL (nur "Scavenger-Rezeptoren" Klasse A) in Monozyten-Makrophagen aufgenommen. Da die Aufnahme von modifiziertem LDL über "Scavenger-Rezeptoren" im Gegensatz zu nativem LDL nicht durch einen negativen Feedback-

Mechanismus reguliert wird, kommt es zur Akkumulation der Lipide in den Makrophagen und damit zur vermehrten Bildung sogenannter Schaumzellen in der Gefäßwand. Gemeinsam mit T-Lymphozyten führen sie zur Ausbildung des sogenannten Fettstreifens ('fatty streak'), der frühesten morphologisch faßbaren Läsion der Arteriosklerose. Bei weiterem Fortschreiten der Läsion entsteht durch den Zerfall von Schaumzellen eine zentrale lipidhaltige Nekrose, die von vitalen Schaumzellen und einer Kollagenfaserschicht umgeben wird und eine Lumenverengung bewirkt. Die Kollagenfaserschicht kann im weiteren Verlauf durch proteolytische Enzyme (Metalloproteinasen) aktivierter Makrophagen aufgelöst werden, so daß Plaqueruptur und Thrombusbildung resultieren. Je nach Thrombuslokalisation können Herzinfarkt oder Schlaganfall die Folge sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde milde oxidiertes LDL verwendet, da es dem physiologisch vorkommenden oxidierten LDL wahrscheinlich am ähnlichsten ist. Einige Effekte des oxidierten LDL sind schon seit längerer Zeit bekannt (Vgl. Tab. 2).

	Monozyten	Endothelzellen	Thrombozyten
oxidiertes LDL	<p>Förderung der Invasion von Blutmonozyten in die Gefäßwand</p> <p>Hemmung der Motilität residenter Makrophagen und Verhinderung ihres Rückstroms ins Gefäßlumen</p> <p>Verstärkte Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen via Scavenger-Rezeptoren und damit Bildung von Schaumzellen</p>	<p>Zytotoxizität von oxLDL schädigt das Endothel</p> <p>Aktivierung des Endothels durch mox-LDL: Aktinstreßfaserbildung und Endothelzellkontraktion</p>	<p>Keine Thrombozytenaktivierung durch oxLDL</p> <p>Gestaltwandel und Aggregation durch mox-LDL</p>

Tab. 2: Effekte von oxidiertem LDL auf Monozyten, Endothelzellen und Thrombozyten

Im Gegensatz zum voll oxidierten LDL, welches zytotoxisch auf Endothelzellen wirkt (Quinn et al., 1985) hat milde oxidiertes LDL *in vitro* einen aktivierenden Effekt auf Endothelzellen (Witzum, 1993), der sich in einer morphologischen Veränderung (Aktinstreßfaserbildung und Endothelzellkontraktion) ausdrückt. Die Aktivierung von Thrombozyten durch mox-LDL führt zum 'shape change' oder sogar zur Aggregation (Ardlie et al., 1989, Weidtmann et al., 1995). Über welche Signalwege mox-LDL zur Aktivierung von Endothelzellen bzw. Throm-

bozyten führt war bisher nur unzureichend bekannt, und soll in dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

Kürzlich wurde von unserer Gruppe gezeigt, daß bei der milden Oxidation von LDL LPA (Lysophosphatidsäure) gebildet wird und daß mox-LDL über den Lysophosphatidsäure (LPA)-Rezeptor zur Endothelzellaktivierung führt (Siess et al., 1999). LPA, ein Lysophospholipid ist strukturell eng verwandt mit Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das auch zur Gruppe der Lysophospholipide gehört. Ihre Verwandtschaft spiegelt sich auch in der Aktivierung ähnlicher oder sogar gleicher Membranrezeptoren wieder. Da in dieser Arbeit das gewebsspezifische ‘Signal ing‘ dieser Phospholipide in HUVEC beleuchtet werden soll, wird im Folgenden auf LPA und S1P näher eingegangen.

1.5. Die Lysophospholipide (LPL) Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P)

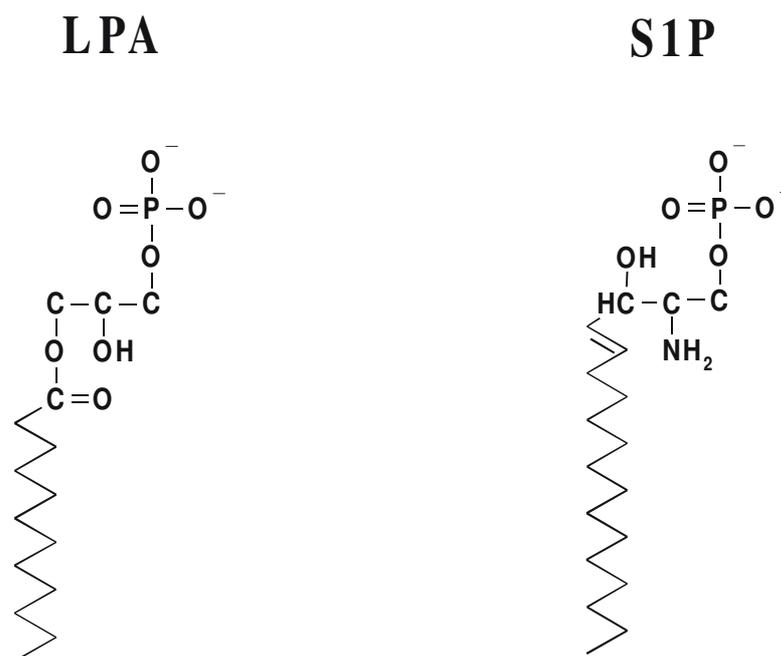


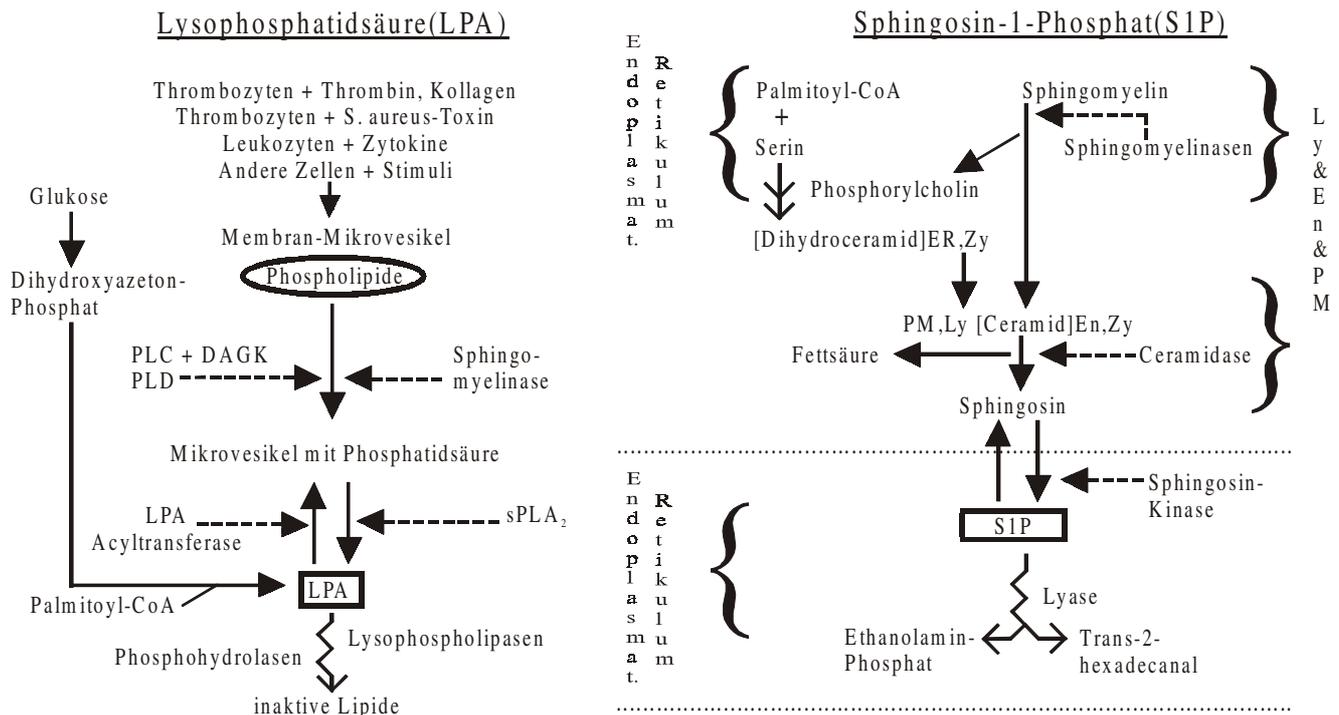
Abb. 2: Strukturformeln für LPA und S1P

Lysophosphatidsäure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind Lysophospholipid-Mediatoren, die in Albumin-gebundener Form in einer Konzentration von bis zu 10µM (LPA) bzw. 0.5µM (S1P) im menschlichen Serum zu finden sind. Sie werden von aktivierten Thrombozyten, Leukozyten oder anderen Zellen gebildet und freigesetzt.

1.5.1. Bildung und Abbau von LPA und S1P

Ihre Bildung erfolgt, wie in Abb. 3 dargestellt, entweder durch de novo Biosynthese oder durch Agonist-induzierte Freisetzung aus Membranlipiden (Goetzl und An, 1998). Der letztgenannte Weg, bei dem LPA und S1P durch enzymatische Spaltung aus Glycerophospholipiden und Sphingomyelin der Membran mobilisiert werden, ist von größerer Bedeutung. Bei Entzündungsreaktionen wird LPA im Plasma durch sekretorische Phospholipase A2 auf Membranvesikeln gebildet (Fourcade et al., 1995), bei Infektionen insbesondere mit *Chlamydia pneumoniae* kann LPA durch die bakterielle Phospholipase D gebildet werden (Van Dimmer et al., 1998). Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß LPA von Tumorzellen gebildet wird. LPA wurde nämlich in der Ascitesflüssigkeit von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom nachgewiesen (Xu et al., 1998). Schließlich wurde von unserer Gruppe kürzlich ein weiterer Bildungsweg für LPA entdeckt. So wurde gezeigt, daß bei der milden Oxidation von LDL LPA gebildet wird und daß die biologische Aktivität von ox-LDL vor allem durch LPA vermittelt wird (Siess et al., 1999).

Der Abbau von LPA zu inaktiven Lipiden erfolgt durch Phosphohydrolasen oder Lyso-phospholipasen. Außerdem kann LPA durch eine LPA-Acyltransferase zu Phosphatidsäure (PA) metabolisiert werden. S1P wird durch eine S1P-Lyase zu Ethanolaminphosphat und Trans-2-Hexadecanal abgebaut. Auf- und Abbaupfade der beiden Phospholipide ähneln sich, doch ist die Kompartimentalisierung der einzelnen Vorgänge bei S1P besser aufgeklärt.



DAGK, Diacylglycerolkinase; PM, Plasmamembran; Ly, Lysosom; En, Endosom; Zy, Zytoplasma;

Abb. 3: Bildung und Abbau von LPA und S1P.

1.5.2. Zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide

Regulation der Zellmorphologie	Regulation des Zellwachstums
Stimulation der Chemotaxis Förderung der Adhäsion Induktion von Kontraktion/Aggregation Induktion der Sekretion	Stimulation/Hemmung der Proliferation Förderung des Überlebens Hemmung der Apoptose Änderung der Zelldifferenzierung

Tab. 3: Zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide

Änderungen von Gefäßstrukturen und Gefäßfunktionen, wie sie bei der Arteriosklerose, beim entzündlichen Gewebsumbau, der Wundheilung und beim Tumorgeschehen vorkommen, unterliegen komplexen Regulationsvorgängen. Diese werden sowohl durch genetische Programme wie auch durch peristatische Faktoren beeinflusst. In den letzten Jahren sind Lipidmoleküle, ihre Zellrezeptoren und angeschlossenen Signalkaskaden sowie die Wechselwirkungen mit Peptidwachstumsfaktoren bei der Zellhomöostase in das Interesse gerückt. LPA und S1P

wirken ähnlich einem Wachstumsfaktor über Zelloberflächenrezeptoren und daran gekoppelte heterotrimere G-Proteine.

1.5.2.1. Regulation der Zellmorphologie

LPA und S1P induzieren eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts. So kommt es in S1P behandelten N1E-115 Neuronen zur Zellabrundung und Neuritenretraktion (Postma et al., 1996). In Fibroblasten induziert LPA eine Zellkontraktion und die Ausbildung kontraktile Aktinstreißfasern (Ridley und Hall, 1992), welche die Voraussetzung für die Zellmigration sind. Zellmigration ist beim Gewebsumbau zum Beispiel im Rahmen der Wundreparatur von Bedeutung. Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß LPA-haltige Salben die Heilung von Hautwunden im Tiermodell beschleunigen (Balazs et al., 1996), so daß spekuliert wurde, daß LPA ein endogener Modulator von Wundreparaturvorgängen ist. Daneben stimuliert LPA die Migration von Monozyten und ist an der Rekrutierung von zirkulierenden Blutzellen bei Entzündungsreaktionen beteiligt (Rizza et al., 1999). Diese LPA-Effekte sind denen von Chemokinen vergleichbar. Im Gegensatz dazu hemmt S1P die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (Kawa et al., 1997) und glatter Gefäßmuskelzellen (Bornfeldt et al., 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß sowohl LPA als auch S1P die Chemotaxis und Migration von Endothelzellen stimulieren (Panetti et al., 1999, Lee et al., 1999). Ras-ähnliche GTPasen, darunter insbesondere Rho, sind zentrale Schalter, über die LPA und S1P die Zellmorphologie regulieren.

1.5.2.2. Regulation des Zellwachstums

LPA und S1P sind Wachstumsfaktoren. Sie steigern die Mitoserate einer Vielzahl von Zelltypen wie zum Beispiel glatter Gefäßmuskelzellen (Tokumura et al., 1994, Guo et al., 1998, Gennero et al., 1999) und sind die wichtigsten im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren für Fibroblasten (Jalink et al., 1994, Michell und Wakelam, 1994). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind die Produktion und Sekretion von Peptidwachstumsfaktoren und die Expression von "early genes" durch Aktivierung von "serum response elements":

LPA und S1P schützen Endothelzellen (Hisano et al., 1999), T-Lymphozyten (Cuvillier et al., 1998, Goetzl et al., 1999) und Makrophagen (Koh et al., 1998, Cuvillier et al., 1996) vor Apoptose. LPA- bzw. S1P-Behandlung induziert in den betroffenen Zellen Apoptoseschutz gegen Noxen wie Hypoxie, UV-Strahlung, Serumentzug und Zytostatika (Moolenaar, 1999). Mit LPA behandelte Spenderorgane zeigen einen deutlich günstigeren Apoptoseindex als

Kontrollorgane (Wu et al., 1997). Signalwege durch die LPA und S1P zur Apoptoseresistenz beitragen sind die Aktivierung der Proteinkinase B/Akt und Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges, sowie die Beeinflussung des bcl-2/Bax-Quotienten, und die Aktivierung von NF-kappaB über die i-kappaB Kinasekaskade (Goetzl et al., 1999, Sharestanifar et al., 1999).

1.5.3. Lysophospholipid-Rezeptoren

In den letzten Jahren wurde eine Familie von Rezeptoren für Lysophospholipide beschrieben. Diese wird als “endothelial differentiation gene“-Familie (Edg-Familie) bezeichnet (Goetzl und An, 1998). Die Bezeichnung Edg leitet sich von der Beobachtung ab, daß Edg-1, das am längsten bekannte Mitglied der Familie, selektiv in Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert ist (Hla und Maciag, 1990). Bisher wurden insgesamt 8 Edg-Rezeptoren beschrieben, die wie in Tabelle 4 dargestellt, eine gewebsspezifische Verteilung zeigen. Edg-1, -3, -5, -6 und -8 bilden S1P-Rezeptoren (Lee et al., 1998, An et al., 1997, Gonda et al., 1999, Van Brocklyn et al., 2000, Malek et al., 2001), Edg-2, -4 und -7 sind Rezeptoren für LPA (Erickson et al., 1998, Goetzl et al., 1999, Im et al., 2000). In Endothelzellen sind vor allem Edg-1, -4 und -5 (präliminäre Daten unserer Gruppe), in Thrombozyten Edg-2, -4, -6 und -7 Rezeptoren exprimiert (Motohashi et al., 2000). Zusätzlich sind die jeweiligen Edg-Rezeptoren an unterschiedliche Signalwege gekoppelt, so daß die LPA- bzw. S1P-Wirkung im jeweiligen Gewebe nur durch Kenntnis der exprimierten Rezeptoren und der von ihnen gewebsspezifisch aktivierten Signalwege, möglich ist. Aufgrund dieser Zusammenhänge können LPA bzw. S1P in verschiedenen Geweben unterschiedliche Wirkungen haben. Im Besonderen könnte sich das Expressionsmuster der Edg-Rezeptoren unter dem Einfluss von Noxen ändern, was möglicherweise die Wirkung von Lysophospholipiden auf die betreffenden Zellen ändert. Bei der malignen Transformation scheint sich ebenfalls die Edg-Rezeptorexpression der betroffenen Zellen verglichen mit Normalgewebe zu ändern. Es ist unklar, ob die Edg-Rezeptorexpression im entzündlich aktivierten Gewebe oder bei Wundheilungsvorgängen verändert ist. Sicher ist jedoch, daß die Expression von Edg-Rezeptoren durch bestimmte Agonisten induziert werden kann. So wird beispielsweise Edg-1 durch PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) in HUVEC (Hla und Maciag, 1990) und Edg-8 durch den Nervenwachstumsfaktor in Neuroblastomzellen induziert (Malek et al., 2001). Weiterhin kann Edg-2 in CD4 T-Zellen durch Behandlung mit Lectin hochreguliert werden (Zheng et al., 2001). Darüber hinaus ist zu erwähnen, daß die Aktivierung von Zellen durch dasselbe Lysophospholipid über Stimulation unterschiedlicher Edg-Rezeptoren teilweise zu gegensätzlichen Effekten führt. So hat die LPA-Aktivierung von

Edg-2 und Edg-4-Rezeptoren in Jurkat Zellen gegensätzliche Wirkungen auf die Migration der Jurkat Zellen (Zheng et al., 2001).

	LPL-Ligand	Vorkommen in versch. Geweben
A. Humane Edg-Proteine		
Edg-1	S1P	Kapillaren, ubiquitär
Edg-3	S1P	KV, Leukozyten
Edg-5	S1P	KV, Gonaden, Plazenta, ZNS
Edg-6	S1P	Lymphat. Gew., Hämatopoese, Lunge
Edg-8	S1P	ZNS, Neuroblastom
Edg-2	LPA	KV, GI, ZNS
Edg-4	LPA	Leukozyten, Testes
Edg-7	LPA	Prostata
B. Xenopus Oozyten, murine PSP24 Proteine		
Xenopus PSP24 murine PSP24 Proteine	LPA LPA	ZNS

Tab. 4: Differentielle Expression von Edg-Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben
KV, Kardiovaskulär, GI, Gastrointestinal

Die Edg-Rezeptoren werden aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz in Homologiegruppen eingeteilt (Goetzl und An, 1998). Die Aminosäuresequenz von menschlichen Edg-2 und Edg-4 weist eine Identität von 46% und eine Ähnlichkeit von 72% auf, Edg-1, Edg-3 und Edg-5 sind in 45-60% der Aminosäuren identisch. Im Gegensatz dazu besteht in der Aminosäuresequenz zwischen Edg-2 und Edg-4 einerseits und Edg-1, Edg-3 und Edg-5 andererseits nur eine Identität von 31-34%. Weiterhin zeigte sich eine partielle strukturelle Homologie der Edg-Proteine mit den Cannabinoidrezeptoren, was möglicherweise auf ein früheres gemeinsames Gen schließen läßt. Die Organisation der Edg-Gene im Genom ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.5.4. Durch Lysophospholipide aktivierte Signalwege

LPA und S1P induzieren durch Aktivierung verschiedener Edg-Rezeptoren und deren Kopplung an verschiedene Pertussis Toxin (PTX)-sensitive und -insensitive heterotrimere G-Proteine verschiedene Signalwege wie in Abb. 4 dargestellt (Goetzl und An, 1998; Siess et al., 2000). Beide Phospholipide können über G_q oder G_i die Phospholipase C (PLC) aktivieren

und so eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bedingen. Weiterhin aktivieren beide über $G_{12/13}$ die kleine GTPase Rho, auf die im nächsten Abschnitt über GTPasen näher eingegangen wird. LPA führt über Aktivierung von G_{13} und über Zwischenschritte zur Rho-Aktivierung (Gohla et al., 1998). Aktiviertes Rho aktiviert sein Effektormolekül p160 Rho-Kinase, diese inaktiviert durch Phosphorylierung die MLK-Phosphatase. Durch Inaktivierung der MLK-Phosphatase, die weniger phosphorylierte MLK dephosphoryliert und durch Aktivierung der Rho-Kinase, die die MLK auch direkt phosphoryliert, erhöht sich die Menge an phosphorylierter MLK. Die phosphorylierte MLK interagiert verstärkt mit F-Aktinfilamenten, was zur Bildung von kontraktile Aktinstreißfasern und zur Gestaltänderung der Zelle, zur Kontraktion führt (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996). Darüber hinaus führen LPA bzw. S1P über PTX-sensitive G_i -Proteine zur Hemmung der Adenylatzyklase und damit zur Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Van Brocklyn et al., 1998). Über G_i erfolgt auch die Aktivierung von ras, MAP Kinasen und "serum response elements"; die zur verstärkten Transkription und Expression von "early genes" und somit zur Zellproliferation führen (Moolenaar et al., 1997, Lee et al., 1998, Zondag et al., 1998). LPA bzw. S1P wirken als Überlebensfaktoren durch Verstärkung der bcl-2 Expression, Aktivierung der Proteinkinase B/Akt und der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Auch Rho spielt für den LPA bzw. S1P-vermittelten Apoptoseschutz eine Rolle, die exakten molekularen Mechanismen sind allerdings nicht bekannt (Goetzl und An, 1998, Moolenaar, 1999). Es ist unklar, ob LPA und S1P das Überleben humaner Endothelzellen bei der Angiogenese durch diese Signalwege beeinflussen.

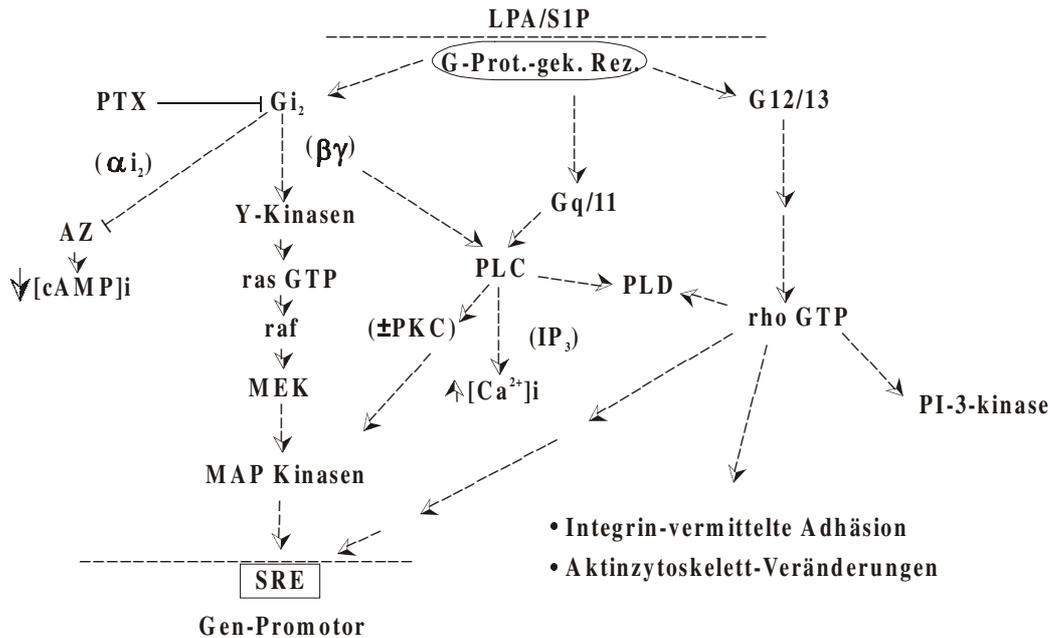


Abb. 4: Aktivierung verschiedener Signalwege über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch LPA oder S1P.

G-Prot.-gek. Rez., G-Protein-gekoppelter Rezeptor, PTX, Pertussis Toxin, AZ, Adenylatzyklase, Y Kinase, Protein Tyrosin Kinase, MEK, MAP Kinase Kinase, IP₃, Inositol Trisphosphat, PLC, Phospholipase C, PLD, Phospholipase D, PI-3-Kinase, Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, SRE, 'serum response element', MAPK, 'mitogen activated protein kinase'

1.5.5. Pathophysiologische Bedeutung von LPA und S1P

1.5.5.1. Angiogenese und Vaskulogenese/Organentwicklung

Es ist bekannt, daß LPA und S1P Angiogenesefaktoren sind (Lee et al., 1999). Angiogenese ist eine Voraussetzung für das Wachstum von Tumoren und Metastasen. Auch im Rahmen der diabetischen Retinopathie und der rheumatoiden Arthritis kommt es zur pathologischen Neubildung von Gefäßen, die zur Destruktion der betroffenen Organe, also z. B. der Retina oder des Gelenkknorpels, führen. Voraussetzung der Angiogenese ist eine Funktionsänderung des Endothels, die das Migrationsvermögen, die Proliferation, Invasivität und Morphologie der Endothelzellen betrifft. LPA und S1P sind potente Mitogene für Endothelzellen und bewirken die Bildung tubulärer Strukturen in der Spätphase der Angiogenese (Lee et al., 1999). Welche Edg-Rezeptoren und Signalwege daran beteiligt sind, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung. In einem Mausmodell konnte kürzlich gezeigt werden, daß Sphingolipide bei der Bildung von Blutgefäßen insbesondere während der embryonalen Entwicklung von Säugetie-

ren eine wichtige Rolle spielen (Liu et al., 2000). So resultiert in Edg-1 knock out Mäusen eine Fehlbildung der Aorta, da die glatten Muskelzellen bei Fehlen von Edg-1 während der Entwicklung der Aorta nicht nach dorsal wandern können. Die Endothelzellen sind normal ausgebildet. Die Aortenfehlbildung allerdings führt zu embryonalen Blutungen und intrauterinem Tod der Edg-1 knock out Mäuse.

1.5.5.2. Thrombozytenaktivierung

LPA ist ein starker Thrombozyten aktivierender Agonist. LPA induziert "shape change" und Aggregation von Blutplättchen (Watson et al., 1985, Gueguen et al., 1999) und wird bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt (Eichholtz et al., 1993). Demgemäß konnten in humanem Serum LPA-Konzentrationen von bis zu 10µM gefunden werden. Weiterhin wurde von unserer Gruppe kürzlich gezeigt, daß LPA während dem "shape change" Tyrosinkinasen der Src- und Syk-Familie aktiviert und davon unabhängig einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom bewirkt (Maschberger et al., 2000). Auch S1P kann Syk-Aktivierung, intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisation (Yang et al., 1996), "shape change" und laut den Daten einer amerikanischen Arbeitsgruppe sogar Aggregation (Yatomi et al., 1995, Yatomi et al., 1997) in Blutplättchen induzieren und wird wie LPA bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt (Yatomi et al., 1995), ist aber insgesamt ein schwächerer Plättchenagonist als LPA (Motohashi et al., 2000). Im menschlichen Serum findet sich S1P in einer Konzentration von bis zu 0.5µM. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß LPA bzw. S1P adhärenente Thrombozyten stimulieren Fibronectin zu binden und damit eine Fibronectin-Matrix zu bilden (Olorundare et al., 2001).

1.5.5.3. Entzündungsreaktionen

Generell wird LPA im Plasma bei Entzündungsreaktionen durch sekretorische Phospholipase A2 auf Membranvesikeln gebildet (Fourcade et al., 1995). Es steigert die endotheliale Permeabilität und wirkt chemotaktisch auf Entzündungszellen. Beispielsweise wirkt es ähnlich den CC Chemokinen chemotaktisch auf Monozyten. Es ist also möglicherweise an der Rekrutierung zirkulierender Blutzellen in Entzündungsherde beteiligt. Sphingosin-1-Phosphat dagegen hemmt die chemotaktische Wirkung des CXC Chemokins Interleukin 8 auf neutrophile Granulozyten (Kawa et al., 1997). Außerdem induziert LPA über den Transkriptionsfaktor NF-kappa B die Expression proinflammatorischer Gene in Endothelzellen (Palmetshofer et al., 1999). Es wird diskutiert, daß LPA an der Pathogenese insbesondere von mesangioproliferativen Glomerulonephritiden beteiligt ist. Dabei scheint LPA als Co-Faktor von Peptidwachstumsfaktoren bei der Induktion der Proliferation von Mesangialzellen zu wirken (Inoue et al.,

1999). Daneben scheint es die Konstriktion von Mesangialzellen zu induzieren und den renalen Blutfluß und die glomeruläre Filtrationsrate herabzusetzen, sowie die Einwanderung von Entzündungszellen ins Nierengewebe zu fördern (Inoue et al., 1999). Die genauen Pathomechanismen sind jedoch nicht untersucht.

1.5.5.4. Wundheilung

Die hohe Serumkonzentration der Phospholipide spiegelt ihre Bedeutung bei der Wundheilung wieder. Diese läßt sich in zwei Phasen, Zellmigration und Zellproliferation, untergliedern. In diesem Zusammenhang wurde in einem *in vitro* Modell kürzlich gezeigt, daß LPA bzw. S1P Monozyten/Makrophagen anlocken und aktivieren. Weiterhin stimulieren sie in der zweiten Phase der Wundheilung die Proliferation von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Lee et al., 2000). *In vivo* finden sich ähnliche Ergebnisse. Die topische Anwendung von LPA auf Hautwunden von Ratten scheint die Epithelneubildung und damit den Wundverschluß bzw. die Wundheilung deutlich zu beschleunigen (Balazs et al., 1996, Balazs et al., 2001). Andererseits kann sich die durch LPA und S1P stimulierte verstärkte Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen auch negativ auswirken, indem sie beispielsweise die Restenosierung nach Koronarangioplastie beschleunigen. In diesem Zusammenhang könnten LPA- und S1P-Rezeptor-Antagonisten hilfreich sein, welche die Proliferation und damit die Restenosierung aufhalten.

1.5.5.5. Tumorausbreitung

LPA wurde in der Ascitesflüssigkeit von Patientinnen mit Peritonealkarzinose bei Ovarialkarzinom nachgewiesen (Xu et al., 1998). Es wurde auch gezeigt, daß LPA das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen steigert (Xu et al., 1995, Fang et al., 2000). Unklar ist, ob LPA generell das Tumorwachstum fördert, da es in Tumorzellen bestimmter Herkunft Apoptose induziert (Moolenaar, 1999). S1P kann das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen sowohl fördern als auch hemmen. Der durch S1P induzierte Zelltod ovarialer Karzinomzellen scheint mit einer Hemmung der Zelladhäsion assoziiert zu sein (Hong et al., 1999). Andererseits schützt S1P Oozyten vor Apoptose, was beispielsweise die Fruchtbarkeit strahlen-oder zytostatikatherapierter Tumorpatientinnen erhalten und damit von herausragender Bedeutung sein kann (Morita et al., 2000). Die Hemmung der Apoptose durch LPA und S1P könnte ferner ihre praktische Anwendung darin finden, daß LPL-Agonisten zur Verlängerung der Überlebenszeit von für Transplantationen gespendeten Organen eingesetzt werden. Außerdem könnten so

durch Ischämie verletzte Myokardzellen oder durch degenerative Erkrankungen geschädigte Nervenzellen vor dem Zelltod geschützt werden.

1.5.5.6. Hirnschrankenpermeabilität

Zuletzt muß noch erwähnt werden, daß LPA die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen scheint (Schulze et al., 1997). Die gesteigerte Permeabilität ist wahrscheinlich auf eine Aktivierung der kleinen GTPase Rho und seines Effektormoleküls Rho-Kinase zurückzuführen (Van Nieuw Amerongen et al., 2000). Die Gefahr der erhöhten Durchlässigkeit besteht darin, daß vermehrt Substanzen aus dem Blutplasma (Eiweiß, Zellen) übertreten und schädliche Stoffe ungehindert die Blut-Hirn-Schranke passieren und Nervenzellen schädigen. Auf diese Weise können beispielsweise entzündliche Erkrankungen, Tumoren oder Hirninfarkte noch verschlimmert werden.

1.6. Die Rho-Familie der kleinen GTPasen

Die kleinen GTPasen der Rho-Familie gehören zur Ras-Superfamilie, zu der auch die Ras-, Rab-, ARF- und die Ran-Familie zählen. Die Entdeckung, daß viele Formen der Krebserkrankung onkogenetische Mutationen der Ras Gene enthalten, hat großes Interesse an der Erforschung der biologischen Rolle der Ras- und Ras-ähnlichen Proteine geweckt. Diese Proteine werden als kleine GTP-bindende Proteine bezeichnet, da ihr Molekulargewicht kleiner ist als das heterotrimerer G-Proteine. Sie besitzen eine intrinsische GTPase-Aktivität. Zur Rho-Familie der kleinen GTP-bindenden Proteine zählen neben RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoG, RhoE und RhoL (Murphy et al., 1996) auch Rac1 und Rac2 sowie die beiden Cdc42-artigen Proteine Cdc42Hs und G25K, ferner TTF und TC10 (Hall, 1994, Tapon und Hall, 1997). Sie besitzen untereinander zu etwa 50-55% Sequenzhomologie, die Homologie gegenüber Ras beträgt etwa 30%.

Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit wichtigen Vertreter der Rho-Familie Rho und Rac näher eingegangen.

1.6.1. Rho und seine Funktionen

Rho wurde erstmals aus einer *Aplysia* c-DNA Bank isoliert (Madaule und Axel, 1985). RhoA/B/C Gene konnten aber bald darauf auch in Säugetierzellen nachgewiesen werden. Als sehr junge Mitglieder der Rho-Familie wurden 1992 die c-DNAs von RhoG (Vincent et al., 1992) und TC10 beschrieben. Die Rho Proteine scheinen in eukaryontischen Zellen ubiquitär

vorzukommen. Funktionell kommt den Rho GTPasen herausragende Bedeutung bei der Organisation des Aktinzytoskeletts zu.

Rho	Rac
Aktinzytoskelett Motilität und Migration Gentranskription	
Permeabilität Apoptose Thrombozytenaktivierung	Neurogenese Myogenese NADPH Oxidase

Tab. 5: Regulatorfunktionen von Rho und Rac

1.6.1.1. Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett einer Zelle ist von großer Bedeutung für Zellmotilität, Phagozytose, Zytokinese und den intrazellulären Transport. Seine Grundstruktur besteht aus Aktinfilamenten und speziellen an Aktin gebundenen Proteinen. In ruhenden, nicht stimulierten Zellen, erkennt man wenig Struktur in der Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente. Sie bilden ein loses Netzwerk. Sobald aber ein Stimulus wie z. B. Thrombin auf die Zellen einwirkt, wird Rho in seine aktive, GTP-gebundene Form überführt und es kommt zu den typischen zellmorphologischen Veränderungen (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996). In der durch Rho aktivierten Zelle erkennt man die Organisation des bis dahin ungeordneten Aktins zu gebündeltem Aktin in Form der sogenannten Aktinstreißfasern. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung der zentralen Streißfasern in menschlichen Fibroblasten über Aktivierung der Rho-Kinase erfolgt, während für die Bildung der peripheren Streißfasern die aktivierte Myosin Leicht Ketten Kinase eine größere Rolle zu spielen scheint (Kato et al., 2001). In der durch Rho aktivierten Zelle können weiterhin sogenannte fokale Adhäsionsstellen nachgewiesen werden, die als Vermittler zwischen der extrazellulären Matrix und dem Intrazellulärraum fungieren und eine Anreicherung Tyrosin-phosphorylierter Proteine wie z. B. Paxillin und fokale Adhäsionskinase beinhalten. An der zytoplasmatischen Seite haben diese Stellen engen Kontakt zum Aktin und gelten dort als Ansatzstellen der Aktinfilamentbündel (Machesky und Hall, 1996). Zum Extrazellulärraum hin stehen sie in engem Kontakt zu den funktionellen Integrinkomplexen.

1.6.1.2. Permeabilität

Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen scheint in Endothelzellen die kleine GTPase Rho durch bestimmte Stimuli aktiviert zu werden. So wurde kürzlich gezeigt, daß während der frühen Phase der Atherosklerose oder während der akuten Entzündungsreaktion Rho durch Thrombin aktiviert werden kann (Essler et al., J Biol Chem, 1998). Ferner induziert das Toxin von *Pasteurella multocida* bei Infektion mit selbigem Erreger eine Rho-Aktivierung (Essler et al., J Immunol, 1998). Aktiviertes Rho führt über Aktivierung der Rho-Kinase und Inaktivierung der MLK-Phosphatase zur MLK-Phosphorylierung, Aktin-Myosin-Interaktion, Endothelzellkontraktion und Ausbildung von Aktinstreißfasern. Diese Veränderungen des Aktinzytoskeletts finden ihr Korrelat in einer erhöhten endothelialen Permeabilität im Sinne einer Endothel-Dysfunktion (Essler et al., J Biol Chem, 1998, Essler et al., J Immunol, 1998, van Nieuw Amerongen et al., 2000, Wojciak-Stothard et al., 2001). Durch die regulative Funktion von Rho bei der Organisation des Aktinzytoskeletts scheint Rho eine herausragende Bedeutung bei der Regulation der Permeabilität in Endothelzellen zu besitzen (Wojciak-Stothard et al., 2001).

1.6.1.3. Motilität und Migration

Die Migration von Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung, Angiogenese und Wundheilung. Die Wundheilung wiederum beinhaltet im Groben zwei Phasen, die vor allem während der ersten 24 Stunden auftretende Zellmigration und die Phase der Zellproliferation, die ungefähr nach 36 Stunden beginnt. Für die Endothelzellmigration ist ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen Aktinpolymerisation und -depolymerisation Voraussetzung. Anhand eines Wundreparaturmodells konnte gezeigt werden, daß die durch Rho induzierten Aktinstreißfasern und fokalen Adhäsionen für die Endothelzellmigration essentiell sind (Aepfelbacher et al., 1997). Rho wurde dabei als wichtiges Regulatorprotein der Aktinpolymerisation und -depolymerisation und damit der Endothelzellmigration identifiziert.

1.6.1.4. Apoptose

Rho scheint T-Zellen aus T-Zell-Lymphomen durch Regulation der Aktinfilament-abhängigen-Zytokinese vor Apoptose zu schützen (Moorman et al., 1996). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß die Rho-Inaktivierung durch das Exoenzym C3-Transferase aus *Clostridium botulinum* zur Hemmung der Aktinfilament-abhängigen Zytokinese, zur Bildung multinukleärer Zellen und Induktion von Apoptose führt (Moorman et al., 1996).

1.6.1.5. Gentranskription, Proliferation und Zellzyklus

Neben der Einflußnahme von Rho auf das Aktinzytoskelett ist eine Rolle bei Signaltransduktionsprozessen belegt. Rho GTPasen können über membranäre Rezeptoren eingegangene extrazelluläre Signale über Kinasekaskaden weiterleiten. Kinasen, die zur großen MAPK ("mitogen activated protein kinase") -Familie gehören, vermitteln die zelluläre Antwort auf verschiedenste Einflüsse wie beispielsweise Stress. Wichtige Substrate für MAPK sind Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern die Steuerung der selektiven Gentranskription wahrnehmen.

Rho reguliert den Ablauf einer MAP-Kinasekaskade zwischen dem LPA-Rezeptor und dem Nukleus, welche über Aktivierung und DNA-Bindung des Serum-responsiblen Transkriptionsfaktors (SRF) zur Transkription von c-fos und damit zur Zellproliferation führt (Hill et al., 1995) (Vgl. Abb. 5). Dominant negative Mutanten von Cdc42Hs oder Rac können über die Inaktivierung von Rho die seruminduzierte DNA-Synthese abschalten.

Rho ist neben Cdc42 und Rac aufgrund seiner Beteiligung an MAPK-Kaskaden auch für die Progression des Zellzyklus in die G1-Phase verantwortlich (Olson et al., 1995).

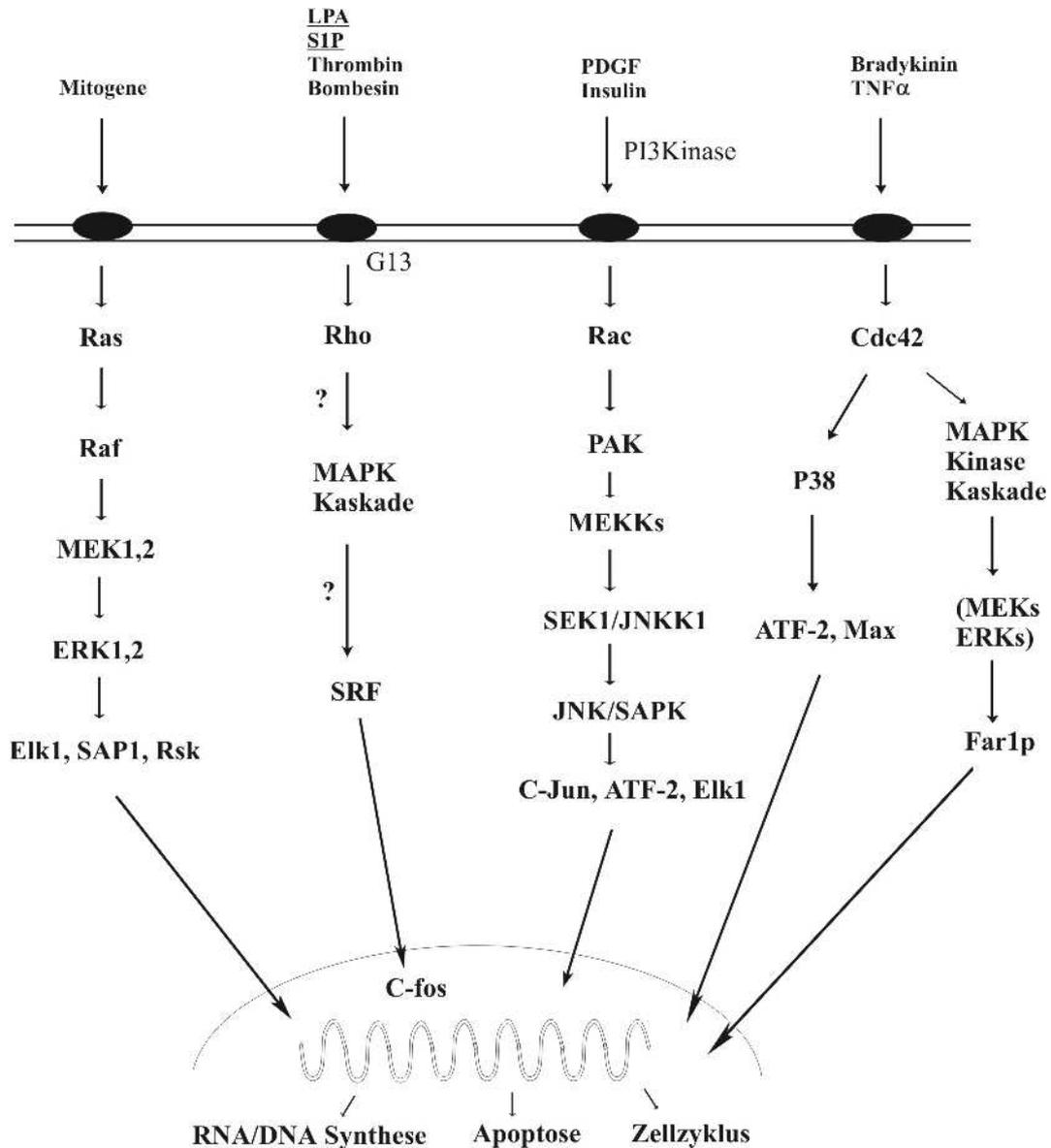


Abb. 5: Übersicht über GTPasen der Rho-Familie und ihre Beteiligung an MAPK Signaltransduktionswegen

Raf, GTPase, MAPK, Mitogen-aktivierte Protein Kinase, MEK=MAPKK, Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase, ERK, durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase, SRF, Serum responsibler Faktor, PAK, p21 aktivierte Kinase, MEKK, MEK Kinase, JNK, c-Jun N-terminale Kinase, SAPK, streßaktivierte Proteinkinase

1.6.1.6. Thrombozytenaktivierung

Die kleine GTPase Rho spielt eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung. So wird durch Rho-Inaktivierung mittels C3-Transferase die Thrombin-induzierte Plättchenaggregation gehemmt (Morii et al., 1992, Nishioka et al., 2001). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, daß aktivierte Rho/Rho-Kinase insbesondere für die Aufrechterhaltung der MLK-Phosphorylierung während der irreversiblen Phase der durch TRAP (Thrombin Rezeptor agonistisches Peptid) induzierten Plättchenaggregation eine wichtige Rolle spielt (Missy et al., 2001). Für den "shape change", welcher meistens die Vorstufe der Aggregation darstellt, ist die MLK-Phosphorylierung essentiell (Daniel et al., 1984). Diese ist durch zwei Wege induzierbar (Bauer et al., 1999, Paul et al., 1999): 1. Ca^{2+} -abhängig durch Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen MLK-Kinase. 2. Ca^{2+} -unabhängig durch Aktivierung von Rho, Rho-Kinase und Inaktivierung der MLK-Phosphatase durch Phosphorylierung der MBS ("myosin binding subunit") (Nakai et al., 1997, Suzuki et al., 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß Rho via $\text{G}_{12/13}$ in Mäuseplättchen aktiviert wird (Klages et al., 1999). Beide Wege können sich ergänzen, jedoch auch unabhängig voneinander erfolgen. Bestimmte Agonisten wie ADP oder Ionomycin aktivieren den erstgenannten, andere Agonisten wie der Thromboxan-Rezeptor-Agonist U46619 oder der Thrombin-Rezeptor-Agonist YFLLRNP aktivieren vor allem letztgenannten Weg. Thrombin aktiviert in niedriger Konzentration den Ca^{2+} -unabhängigen, in hoher Konzentration beide Wege (Bauer et al., 1999). Ferner scheint in Thrombin-stimulierten Thrombozyten aktiviertes Rho die Integrin-abhängige Translokation von p160 Rho-Kinase ans Zytoskelett (Fujita et al., 1997) bzw. die Aktivierung und Translokation von PIP5K (Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase) an die Zellmembran zu induzieren (Chatah und Abrams, 2001). Weiterhin kommt Rho eine herausragende Bedeutung bei der Regulation der Integrin-Affinität insbesondere von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ in Thrombozyten zu (Leng et al., 1998).

1.6.2. Rac und seine Funktionen

Humanes Rac1 und 2 sind auf Aminosäureebene zu 92% identisch, wobei Rac1 ubiquitär exprimiert wird und die Rac2 Expression, soweit bekannt, auf hämatopoetische Zelltypen beschränkt ist (Didsbury et al., 1989).

1.6.2.1. Aktinzytoskelett

Bei der Erforschung der Funktion von Rac wurde auf die Mikroinjektion von rekombinantem, konstitutiv aktivem V12Rac oder dominant hemmendem N17Rac zurückgegriffen. Die Mik-

roinjektion von Rac in konfluente, serumdepletierte 3T3-Fibroblasten führte zur Polymerisation von Aktinfilamenten im Bereich der Plasmamembran und "membrane ruffling". Da einige Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, Insulin) unter Vermittlung der PI-3-Kinase in 3T3-Zellen ebenfalls subkortikale "membrane ruffles" induzieren können, und sowohl das nach Injektion von Rac auftretende als auch das Wachstumsfaktor-vermittelte "membrane ruffling" durch die Mikroinjektion des dominant inhibitorischen Rac Proteins N17Rac hemmbar sind, nimmt man an, daß auch für das Wachstumsfaktor-vermittelte "ruffling" Rac nötig ist (Ridley et al., 1992). Daneben führt die Mikroinjektion zur Ausbildung von Lamellipodien. Die subkortikale Aktinorganisation in "membrane ruffles" und Lamellipodien, welche Orte Membran assoziierter Aktinpolymerisation darstellen, scheint also durch die kleine GTPase Rac reguliert zu werden.

1.6.2.2. Motilität und Migration

Die exakte biologische Bedeutung des "membrane ruffling" ist nicht bekannt. Man nimmt aber an, daß es für die Zellmigration und für Pinozytosevorgänge von entscheidender Bedeutung ist. Lamellipodien sind für die Zellpolarisierung bei der Migration verantwortlich und treten z. B. bei der Chemotaxis auf. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich gezeigt werden, daß Rac ein wichtiges Regulatorprotein der Zellmotilität ist. Aktives Rac erhöht die Zellmotilität von Fibroblasten (Kjoller und Hall, 2001) bzw. reguliert die Aktinreorganisation und Zellpolarität in Dictyostelium Zellen während der Chemotaxis (Chung et al., 2000). Weiterhin kann aktiviertes Rac die Invasion bestimmter Tumorzellen *in vitro* fördern (Price und Collard, 2001).

1.6.2.3. Neurogenese und Myogenese

Bei *Drosophila melanogaster* werden Rac-homologe Gene, Drac1, im Nervensystem und Mesoderm während der Neural- bzw. der Muskeldifferenzierung stark exprimiert. Die Expression konstitutiv aktiver oder dominant negativer Drac1 Mutanten in diesen Geweben führt zu Defekten beim axonalen und dendritischen Wachstum sowie zu Abnormalitäten bei der Myoblastenfusion (Luo et al., 1994). Dies legt eine Schlüsselrolle der kleinen GTPase Rac bei der Neurogenese und der Myogenese nahe (Luo et al., 1994).

1.6.2.4. Regulation der NADPH Oxidase

In Neutrophilen und anderen professionell phagozytierenden Zellen erfüllen Rac-Proteine eine Spezialfunktion bei der Regulation der NADPH Oxidase (Segal und Abo, 1993). Rac2

scheint dabei die prädominierende Form im neutrophilen Zelltypus darzustellen (Quinn et al., 1993) und reguliert die NADPH-abhängige Produktion von Superoxidanionen (O_2^-) (Bokoch et al., 1994, Bokoch, 2000). Dabei ist die posttranslationale Prozessierung von Rac für die Assemblierung des NADPH-Komplexes unverzichtbar. Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, daß die durch Depolarisation induzierte Bildung von Superoxidanionen in Endothelzellen über Aktivierung/Translokation von Rac erfolgt (Sohn et al., 2000) und daß CNF1, ein Toxin aus *E. coli*, die Bildung von Superoxidanionen in Epithelzellen Rac-abhängig steigert (Falzano et al., 2001).

1.6.2.5. Gentranskription

Rac induziert selektiv die Gentranskription über die p21 aktivierte Kinase (PAK) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK)/streßaktivierte Proteinkinase (SAPK) (Vgl. Abb. 5). Rac1 ist auch an der Aktivierung der Nef-assoziierten Kinase (NAK), die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu PAK aufweist, beteiligt (Lu et al., 1996). Eine Aktivierung der Kinasewege durch onkogene Proteine wie Dbl, einem Nukleotid austauschfaktor, wird durch dominant negative Rac1-Mutanten blockiert und die Aktivierung durch inflammatorische Zytokine oder Wachstumsfaktoren verhindert (Coso et al., 1995). Die verschiedenen ablaufenden Kinasekaskaden sind hochgradig konserviert und können entweder unabhängig oder auch in Kooperation miteinander wie in einem verschalteten Netzwerk ablaufen. Die Wahrscheinlichkeit, daß die Rho GTPasen auf unterschiedliche Signaltransduktionswege Einfluß nehmen können ist dabei offensichtlich.

1.6.3. Regulation der GTPase-Aktivität der Rho GTPasen

Die GTPasen der Rho-Familie liegen entweder in einer aktiven, GTP-gebundenen, oder in der inaktiven, GDP-gebundenen Form vor. Die GTP-Bindung hat eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge, die ihm die Exposition einer "binding site" zur Wechselwirkung mit spezifischen Zielproteinen ermöglicht (Stouten et al., 1993). Beide Formen können ineinander übergeführt werden. Das Umschalten von der aktiven zur inaktiven Form und umgekehrt ist abhängig von der intrinsischen GTPase-Aktivität des betreffenden Proteins. Diese wird durch drei unterschiedliche Klassen von Regulatorproteinen kontrolliert. **"GTPase aktivierende Proteine"** (GAPs) beschleunigen die Überführung der GTP-gebundenen Form in die GDP-gebundene Form durch Steigerung der intrinsischen GTP-Hydrolaseaktivität des Proteins bis um den Faktor 10^5 . Die Fähigkeit des betreffenden Proteins mit Zielstrukturen in Wechselwirkung zu treten wird dadurch vermindert. **"Guanin -Nucleotid-Exchange-Factors"** (GEFs) beschleunigen den Austausch von GDP gegen GTP, wodurch das betreffende Protein vermehrt in der aktiven Form vorliegt. Die **"Guanin -Nucleotid-Dissociation-Inhibitors"** (GDIs) können sowohl die GTP-, als auch die GDP-gebundene Form stabilisieren, wirken also der GAP-, und der GEF-Wirkung entgegen (Abb. 6). Die Regulatorproteine besitzen eine große, jeweils unterschiedliche Anzahl funktioneller Domänen, die ihnen die Interaktion mit einem Netzwerk von zellulären Strukturen, Enzymen und auch untereinander ermöglichen (Boguski und McCormick, 1993). Die Rho Aktivität kann demgemäß von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden.

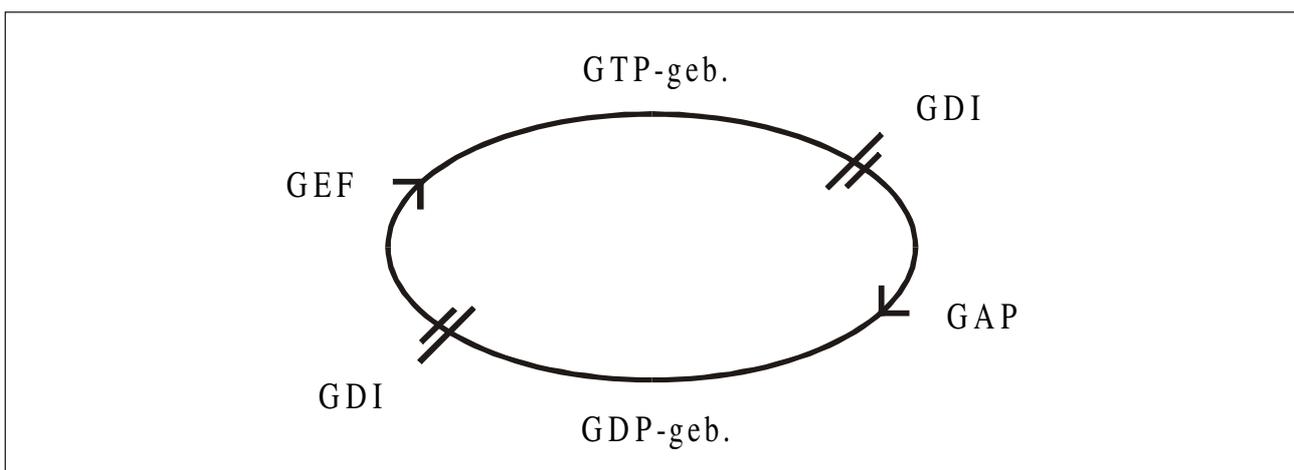


Abb. 6: Regulation der GTPase-Aktivität der Rho GTPasen.

Rho GTPasen werden durch best. Regulatorproteine aus der aktiven GTP-gebundenen in die inaktive GDP-gebundene Form überführt und umgekehrt.

GEF, ‘Guanin -Nucleotid-Exchange-Factor‘; GDI, ‘Guanin -Nucleotid-Dissociation-Inhibitor‘; GAP, GTPase aktivierendes Protein.

1.6.4. Aktivierung der Rho GTPasen

Die Signaltransduktionsschritte zwischen Membranrezeptoren und den kleinen GTP-bindenden Proteinen Rho, Rac und Cdc42 konnten bisher nicht endgültig charakterisiert werden. Bekannt ist jedoch, daß Lysophospholipide wichtige Aktivatoren der kleinen GTPase Rho sind wie in Abb. 5 und 7 dargestellt. So aktiviert LPA über das heterotrimere G-Protein G_{13} und den EGF (‘epidermal growth factor‘) -Rezeptor, der Tyrosinkinase-Aktivität besitzt, Rho in 3T3-Zellen (Gohla et al., 1998). Weiterhin induziert LPA über Aktivierung von Rho in Fibroblasten eine Zellkontraktion und die Ausbildung kontraktile Aktinstreißfasern (Ridley und Hall, 1992), welche die Voraussetzung für die Zellmigration sind. Rho kann auch durch S1P aktiviert werden, was in N1E-115 Neuronen zur Zellabrundung und Neuritenretraktion führt (Postma et al., 1996). Die kleine GTPase Rac wird beispielsweise durch PDGF (‘platelet derived growth factor‘) oder Insulin stimuliert, an der Signaltransduktion scheint auch die PI3 (Phosphatidylinositol-3)-Kinase beteiligt zu sein (Nobes et al., 1995). Ferner besteht Anhalt, daß Bradykinin Cdc42 in 3T3-Fibroblasten aktiviert, was sich in der Ausbildung von Filopodien äußert (Kozma et al., 1995).

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß die drei GTPasen der Rho-Familie sich gegenseitig nach Art einer Kaskade aktivieren können (Vgl. Abb. 7): In 3T3-Zellen vermag mikroinjiziertes Cdc42 Rac und auch Rho zu aktivieren. Injiziertes Rac aktiviert Rho ebenfalls, nicht aber Cdc42. Mikroinjiziertes Rho aktivierte weder Rac noch Cdc42 (Nobes und Hall, 1995). Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse, die bisher nur in 3T3-Fibroblasten nachgewiesen wurden, wurde postuliert, daß *in vivo* Cdc42 Rac aktiviert, welches wiederum Rho zu aktivieren vermag. Interessanterweise konnte kürzlich jedoch gezeigt werden, daß Rac Rho auch hemmen kann (Van Leeuwen et al., 1999). So induzierte aktiviertes Rac die Zellausbreitung neuronaler Zellen und wirkte der Rho-vermittelten Zellabrundung und Neuritenretraktion entgegen (Van Leeuwen et al., 1999). Die antagonistischen Effekte zwischen Rac und Rho im Rahmen der Regulation der Zell- insbesondere der Nervenzellmorphologie konnten kürzlich von einer weiteren Gruppe gezeigt werden (Yamaguchi et al., 2001). So induziert der Nervenwachstumsfaktor über Aktivierung von Rac1 und gleichzeitige Inaktivierung von RhoA die Bildung von Neuriten. Die Aktivierung von Rho/Rho-Kinase dagegen hemmt die durch den Nervenwachstumsfaktor induzierte Rac-Aktivierung. Daher kommt es in Rho aktivierten

Zellen nicht zur Neuritenbildung, sondern zur Ausbildung eines peripheren Rings aus kortikalen Aktinfilamenten (Yamaguchi et al., 2001). Abb. 7 zeigt die hypothetischen Signaltransduktionswege.

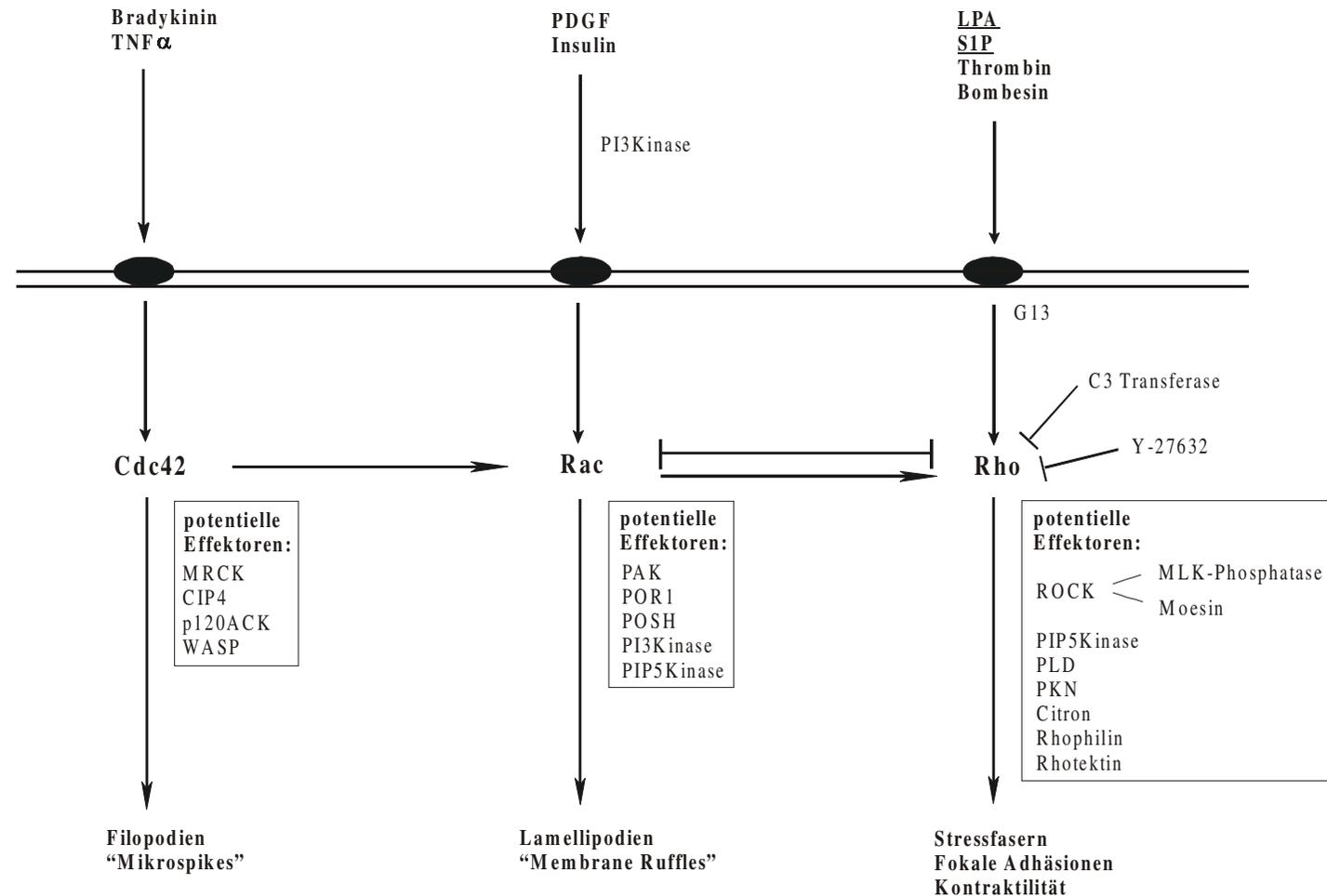


Abb. 7: Signaltransduktion zwischen Lysophospholipiden/Wachstumsfaktoren, membrangebundenen Rezeptoren und den Rho GTPase-Kaskaden und Aktivierung der Rho GTPasen untereinander nach Art einer Kaskade.

MRCK, "myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase", CIP4, Cdc42-interagierendes Protein, p120ACK, aktivierte Cdc42 Kinase, WASP, Wiskott Aldrich Syndrom Protein, PAK, p21 aktivierte Kinase, POR1, "partner of Rac", POSH, "plenty of SH3 domains", PI3Kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP5Kinase, Phosphatidylinositolphosphat-5-Kinase, ROCK, Rho-Kinase, PLD, Phospholipase D, PKN, Proteinkinase N

6.5. Effektorproteine der Rho GTPasen

Die kleinen GTPasen besitzen Bindungsstellen für multiple Wechselwirkungen mit Ziel- und Effektorstrukturen. In diesem Rahmen soll nur eine Auswahl der für diese Arbeit wichtigen Vertreter vorgestellt werden.

Die Serin/Threonin-Kinase P160ROCK (Rho-Kinase) ist ein spezifisches Effektorprotein von Rho (Narumiya, 1996) und spielt eine wichtige Rolle für die Aktinorganisation. Die Rho-Kinase kann die 130 kD MBS ("myosin binding subunit") der MLK-Phosphatase phosphorylieren (Nakai et al., 1997) und die MLK-Phosphatase dadurch inaktivieren (Vgl. auch Abb. 1). Ferner kann die Rho-Kinase die Myosin Leicht Kette auch direkt phosphorylieren (Amano et al., 1996). Die phosphorylierte MLK interagiert verstärkt mit Aktinfilamenten, was zu Aktinzytoskelettveränderungen wie Aktinstreißfaserbildung und Zellkontraktion führt. Ein weiterer Effektor der Rho-Kinase ist das Protein Moesin. Moesin, ein Mitglied der ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) Proteinfamilie, stellt ein wichtiges Verbindungsprotein zwischen den Aktin-Myosin-Filamenten und der Plasmamembran dar. Die durch die Rho-Kinase induzierte Moesin-Phosphorylierung am Thr-558 bewirkt eine Konformationsänderung des Moesins, das dann in der Lage ist über den N-Terminus an die Plasmamembran und über den C-Terminus an F-Aktin zu binden (Nakamura et al., 1995, Matsui et al., 1998). Die Moesin-Phosphorylierung und die dadurch bedingte Verankerung der Aktin-Myosin-Bündel in der Plasmamembran ist neben der MLK-Phosphorylierung für die Auslösung des "shape change" der Thrombozyten entscheidend. Dadurch sprich durch die Verankerung in der Plasmamembran sind die Aktin-Myosin-Bündel nämlich in der Lage, die mechanischen Kräfte, die für die Induktion des "shape change" not wendig sind, aufzubringen. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, daß während der Thrombozyten-Aktivierung durch Thrombin Moesin phosphoryliert wird (Nakamura et al., 1995). Weiterhin spielt die durch Rho- bzw. Rho-Kinase vermittelte Moesin-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Bildung Mikrovilli-ähnlicher Strukturen in COS7-Zellen (Oshiro et al., 1998) bzw. bei der Relokalisation von ERM Proteinen in die Aktinausläufer in Fibroblasten (Shaw et al., 1998). Interessanterweise wurde kürzlich außerdem gezeigt, daß phosphoryliertes Moesin auch ein Effektormolekül der MLK-Phosphatase ist, welche phosphoryliertes Moesin dephosphorylieren kann (Fukata et al., 1998).

Ein wichtiges Effektorprotein von Rac ist die p21 aktivierte Kinase (PAK), welche ebenfalls eine Serin/Threonin-Kinase darstellt (Bokoch, 2000). Sie ist für bestimmte Aktinzytoskelett-

veränderungen wie Neuritenbildung, Zellpolarisierung und -motilität von herausragender Bedeutung (Daniels und Bokoch, 1999). Weiterhin spielt sie eine Rolle bei der Signaltransduktion über SH3-Domänen bzw. bei der Caspase-vermittelten Proteolyse insbesondere im Rahmen der Apoptose (Knaus und Bokoch, 1998). Die biologischen Funktionen der p21 aktivierten Kinase beruhen auf Protein-Protein-Interaktionen sowie Phosphorylierung bestimmter Substrate (Knaus und Bokoch, 1998). Kürzlich wurde gezeigt, daß Rac nach Translokation an die Plasmamembran und Adhäsion an die extrazelluläre Matrix an PAK koppelt und PAK aktiviert (del Pozo et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, daß Rac und PAK in peripheren Nerven der Ratte exprimiert und assoziiert sind (Terashima et al., 2001).

Die 190 kDa Serin/Threonin-Kinase MRCK ("myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase") ist ein wichtiges Effektormolekül der kleinen GTPase Cdc42. Dabei ähneln die p21-bindenden Domänen der MRCK denen der p21-aktivierten Kinase, die Kinase-Domänen dagegen ähneln denen der Rho-Kinase. Wie die Rho-Kinase kann auch die MRCK die Myosin Leicht Kette in nicht-muskulären Zellen am Serin 19 phosphorylieren, ein Vorgang, der für die Aktin-Myosin-Interaktion und Zellkontraktilität von Bedeutung ist (Leung et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß MRCK α und konstitutiv aktives Cdc42V12 in der Zellperipherie in transfizierten HeLa-Zellen kolokalisieren, wobei die MRCK eine wichtige Rolle bei der durch Cdc42 induzierten Bildung der "mikrospikes"/Filopodien spielt (Leung et al., 1998). Der zugrundeliegende Signaltransduktionsweg stellt sich wahrscheinlich wie folgt dar: Cdc42 aktiviert die MRCK, welche daraufhin eine Phosphorylierung/Aktivierung bestimmter LIM-Kinasen induziert. LIM-Kinasen sind Proteine, die sog. LIM-Domänen enthalten. LIM-Domänen, die in vielen wichtigen Proteinen wie Kinasen oder Transkriptionsfaktoren vorkommen, haben eine zinkfingerartige Struktur, welche bei Protein-Protein-Interaktionen eine wichtige Rolle spielt. Die LIM-Kinasen wiederum phosphorylieren/inaktivieren ADF (Aktin depolymerisierender Faktor)/Cofilin und bewirken so die Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Sumi et al., 2001). Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, daß durch Cdc42 aktivierte MRCK das ERM-Protein Moesin am C-terminalen Threonin phosphorylieren kann, was ebenfalls für die Ausbildung der durch Cdc42 induzierten Filopodien von entscheidender Bedeutung ist (Nakamura et al., 2000). Da allerdings noch viele Unklarheiten bestehen, muß das Zusammenspiel bzw. die Wechselwirkung der einzelnen Effektormoleküle in Zukunft noch genauer charakterisiert werden.

1.6.6. Strategien zur Rho- und Rho-Kinase-Hemmung

1.6.6.1. Rho-Hemmung durch C3-Transferase aus *Clostridium botulinum*

Die Bakterien der Gattung *Clostridium botulinum* produzieren ein Exoenzym, das 25kD Protein C3-Transferase. Dieses bakterielle Toxin ADP-ribosyliert Rho an der Aminosäure Asparagin 41 (Vgl. Abb. 8) (Aktories et al., 1989). Die dadurch induzierte sterische Veränderung in der sogenannten Effektorregion, in der Rho mit seinen Substraten in Wechselwirkung tritt, gilt als Erklärungsansatz für die Hemmung der Rho-Aktivität (Sekine et al., 1989). Die C3-Transferase gelangt durch einen Endozytosemechanismus in die Zellen. Die Mikroinjektion der C3-Transferase in unterschiedliche Zelllinien, wie z. B. in 3T3- oder Vero-Zellen, hat den vollständigen Verlust der Aktinstreißfaserbildung (Chardin et al., 1989) sowie der fokalen Adhäsionsstellen zur Folge (Ridley und Hall, 1992).

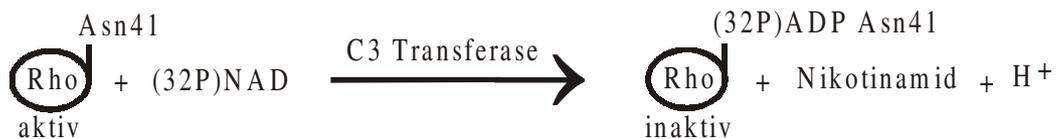


Abb. 8: ADP-Ribosylierung von Rho durch C3-Transferase

1.6.6.2. Rho-Kinase-Hemmung durch Y-27632

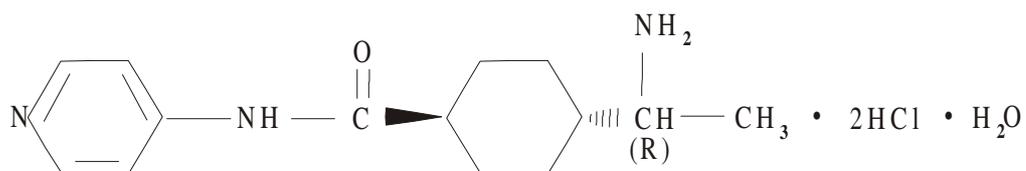


Abb. 9: Strukturformel für Y-27632

1997 wurde Y-27632 ((+)-(R)-trans-4-(1-Aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexancarboxamid-dihydrochlorid-monohydrat) erstmals als spezifischer Inhibitor der Rho-Kinase identifiziert (Uehata et al., 1997). Y-27632 wird durch Carrier-vermittelte erleichterte Diffusion in Zellen aufgenommen und bewirkt durch Bindung an die katalytische Untereinheit eine spezifische Hemmung der Rho-Kinase (Ishizaki et al., 2000, Narumiya et al., 2000). Dadurch werden die durch Rho via Rho-Kinase induzierten Wirkungen wie beispielsweise Aktinstreißfaserbildung, Zellkontraktion, Thrombozytenaktivierung, Zelltransformation oder Tumorzellinvasion in

Abhängigkeit vom Zelltyp und der Konzentration des Rho-Kinase Inhibitors unterschiedlich stark gehemmt.

2. Zielsetzung und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellbiologischen Auswirkungen in venösen Endothelzellen nach Stimulation mit ox-LDL, LPA oder S1P untersucht.

In einem vorangegangenen Forschungsprojekt unserer Arbeitsgruppe, konnte gezeigt werden, daß bei der milden Oxidation von LDL LPA gebildet wird und daß milde oxidiertes LDL über den LPA-Rezeptor Thrombozyten aktiviert (Siess et al., 1999). Weiterhin konnte in einem anderen Forschungsprojekt, bei welchem die Erforschung der Auswirkungen von mit Thrombin inkubierten Endothelzellen im Vordergrund stand, gezeigt werden, daß Thrombin die Rho/Rho Kinase aktiviert, die wiederum die MLC-Phosphatase phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Die daraus resultierende vermehrte MLC-Phosphorylierung führt zur Endothelzellkontraktion, die sich in einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität äußert (Essler et al., J Biol Chem, 1998).

Aufgrund der Vorarbeiten war es interessant herauszufinden wie Endothelzellen auf das Einwirken von ox-LDL reagieren würden und wie sie im Vergleich dazu auf die Stimulation durch LPA reagieren. Außerdem stellte sich die Frage, wie Endothelzellen auf die Stimulation mit S1P, einem Lysophospholipid, das der LPA strukturell ähnlich ist, reagieren würden. Welche Signaltransduktionswege aktivieren ox-LDL, LPA und S1P? Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten zeigen sich in der Reaktion der Endothelzellen nach Stimulation mit ox-LDL, LPA bzw. S1P? Die Charakterisierung der Signaltransduktionswege, über die ox-LDL zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität und damit zur endothelialen Dysfunktion führt, ist von zentraler Bedeutung, da man sie dann durch Inhibitoren an spezifischen Stellen blockieren und so der Arteriosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen vorbeugen kann.

Aufgrund der vorangegangenen Forschungsprojekte war es außerdem interessant zu untersuchen über welche Signalwege ox-LDL und LPA Thrombozyten aktivieren.

Die folgenden Fragen sollten nacheinander beantwortet werden:

a) Fragen, die die Endothelzellen betreffen:

1. Da bekannt ist, daß ox-LDL zur Erhöhung der endothelialen Permeabilität und damit zur endothelialen Dysfunktion führt, was nach R. Ross, das entscheidende Ereignis ist, welches zur Entstehung der Arteriosklerose führt, war es im Fall von ox-LDL insbesondere interessant herauszufinden, ob die erhöhte Permeabilität durch entsprechende morphologische Veränderungen bedingt ist. Weiterhin stellte sich die Frage, welche Rolle die kleine GTPase Rho bei der Induktion der zellmorphologischen Veränderungen spielt.
2. Welche morphologischen Veränderungen werden durch ox-LDL, LPA und S1P in venösen Endothelzellen induziert? Welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten gibt es im Vergleich der morphologischen Veränderungen der verschiedenen Agonisten im Zeitverlauf?
3. Sind die morphologischen Veränderungen durch Aktivierung der Rho GTPasen bedingt?
4. Führen ox-LDL, LPA und S1P zur "downregulation" der MLC -Phosphatase in HUVEC und welche Signalwege sind daran beteiligt? Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede bestehen bezüglich der Zeitverläufe der Phosphatase-Aktivität?
5. Erhöhen ox-LDL, LPA oder S1P die MLC-Phosphorylierung in Endothelzellen, was beispielsweise durch Inaktivierung der MLC-Phosphatase bedingt sein könnte?

b) Fragen, die die Thrombozyten betreffen:

1. Über welche Signalwege induzieren ox-LDL und LPA die Aktivierung/"shape change" der Thrombozyten (über Aktivierung von Rho)?
2. Steigern ox-LDL und LPA die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten und welche Signalwege sind daran beteiligt?
3. Steigern ox-LDL und LPA die Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten? Welche Signalwege sind daran beteiligt?

4. Erhöhen ox-LDL und LPA die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Thrombozyten?
Wenn ja, ist diese Ca^{2+} - Freisetzung eventuell an der Aktivierung der Thrombozyten beteiligt?

3. Material

3.1. Substanzen allgemein

Mox-LDL, eigene Präparation

Lysophosphatidsäure, Sigma, Deisenhofen

Sphingosin-1-Phosphat, Calbiochem, Bad Soden

Rekombinante C3-Transferase, exprimiert als Glutathion S-Transferase-Fusionsprotein in E. coli

Y-27632, Akiko Yoshimura, Yoshitomi Pharmaceuticals

3.2. Spezielle Substanzen, Verbrauchsmittel und Geräte für:

3.2.1. Endothelzellkultur

menschliche Nabelschnüre

Plastikkulturflaschen, Tissue Culture Products, Dannstadt

Falcon Petrischalen (Ø100mm), Becton Dickinson, Lincoln Park, USA

Costar 6-well Kulturplatten, Becton Dickinson

Nunc 8-well Kulturplatten, Becton Dickinson

mikroskopische Deckgläser, Cellocate glass coverslips, Eppendorf, Hamburg

Kollagen G, Biochrom, Berlin

PBS (mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung), Sigma

Endothelzellwachstumsmedium, Promo Cell, Heidelberg

Endothelial cell growth Supplement/Heparin, Promo Cell

Endothelzellbasalmedium, Promo Cell

Fetales Kälberserum (FKS), Sigma

Trypsin, Sigma

3.2.2. Isolierung menschlicher Thrombozyten und Messung des ‘shape change‘

Aspirin, Fluka

Apyrase (ADPase), Sigma

Zitronensäure, EDTA: Merck

HEPES-Puffer

LABOR Aggregometer

3.2.3. Immunfluoreszenz

3,7% Formaldehydlösung (3,7% Formaldehyd [Sigma] in PBS + 1mM Ca²⁺ + 1mM Mg²⁺)

Aceton, Sigma

Rhodamin-Phalloidin, Molecular Probes, Oregon, 1/20 in PBS

Mowiol, Calbiochem

0,2% p-Phenylenediamin, Sigma

Leica RBM 3 Fluoreszenzmikroskop

Kodak T-Max 400 Filme

3.2.4. Mikroinjektion

Eppendorf Transjector 5246

Eppendorf Micromanipulator 5171

Dominant hemmendes N17 Rac, exprimiert in E. coli

Mikroinjektionspuffer (150mM NaCl, 50mM Tris, 5mM MgCl₂, pH 7,5)

Ratten-IgG (5mg/ml), Sigma

FITC-konjugiertes anti-Ratten-IgG aus der Ziege, Dianova, Hamburg

3.2.5. Myosin Leicht Ketten Phosphorylierung

Mini Protean II Electrophoresis Cell, Bio Rad, München

Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad

PVDF-Transfermembran, Immobilon-P, Millipore

Luminol solution, Pierce

Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, Sigma

Molekulargewichtsmarker, Bio Rad

TEMED, Sigma

Acrylamid/bis-Acrylamid, Sigma

Ammoniumpersulfat (APS), Sigma

Sodiumdodecylsulfat (SDS), Bio Rad

Glycin, Bio Rad

Tween 20, Bio Rad

2-Mercaptoethanol, Sigma

Blotting Grade Blocker, Non-Fat Dry Milk, Bio Rad

X-Omat AR Film, Kodak

anti-phospho-MLC-Antikörper, Dr. James Staddon, EISAI Co., London, UK

Peroxidase markiertes Esel-anti-Kaninchen-IgG, Amersham

monoklonaler Maus-IgM-Antikörper gegen totale MLC, Sigma

Sharp XL-325 Densitometer

Lysepuffer(Laemmli)

Tris-HCl	30mM
SDS	9%
Glycerol	15%
Bromphenol Blau	0.05%
2-Mercaptoethanol	5%

SDS-Sammelgelpuffer (SGP)

Tris-HCl	0.5M
SDS	0.4%
pH	6.8

SDS-Trenngelpuffer (TGP)

Tris-HCl	1.5M
SDS	0.4%
pH	8.8

SDS-PAGE Laufpuffer

Tris	0.025M
Glycin	0.2M
SDS	0.1%

SDS Blot Transferpuffer

Tris	0.025M
Glycin	0.096M

TBST Puffer

Tris	2mM
NaCl	15mM
Tween 20	0.3%
pH	7.4

SDS-PAGE-Gele

	Sammelgel (4%)	Trenngel (12.5%)
Aqua bidest	1.55ml	1.6ml
SGP	0.625ml	-
TGP	-	1.25ml
Acrylamid/bis	0.325ml	2.08ml
APS	12.5µl	25µl
TEMED	2.5µl	2.5µl

3.2.6. Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten

anti-phospho-Thr-558-Moesin-Antikörper, Kozo Kaibuchi, Ikoma, Japan

ansonsten gleiche Substanzen wie unter 3.6. Myosin Leicht Ketten Phosphorylierung

3.2.7. Präparation myosinreicher Endothelzellfraktionen

Homogenisierungspuffer

Tris-HCl	50mM
EDTA	0.1mM
pH	7.5
Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin):	je 1µg/ml

‘High Salt‘Puffer

NaCl	0.6M
Tween 20	0.1%
Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin):	je 1µg/ml

“Assay“Puffer

Tris-HCl	50mM
EDTA	0.1M
β-Mercaptoethanol	28mM
pH	7.5
Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin):	je 1µg/ml

Costar Cell Scraper

Insulin-Spritzen, Braun

anti-PP1-Antikörper (rabbit polyclonal IgG), UBI

3.2.8. Messung der Myosin Phosphatase-Aktivität

Protein Phosphatase Assay System, Life Technologies, Gaithersburg, MD

[γ-³²P]ATP

Phosphorylierungspuffer(250mM Tris-HCl(pH 8,2), 16,7mM MgCl₂, 1,67mM ATP, 0,83mM CaCl₂, 133mM 2-ME)

Ammoniumpersulfatlösung(90%, 45%)

Amicon Centricon-30R Konzentratoren, Beverley, MA

TCA(20%)

Wallac 1410 liquid scintillation counter, Gaithersburg

3.2.9. Messung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration

FURA-2 AM, Calbiochem

HEPES-Puffer(20mM HEPES, 120mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,4mM MgSO₄, 0,5mM CaCl₂, 1,4mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 10mM Glukose, pH 7,4)

double excitation Spectrofluorimeter, AMKO Light Technology, Tornesch

3.2.10. Messung der endothelialen Permeabilität

Meerrettichperoxidase, Sigma

Kollagen-beschichtete Polyethyleneinsätze, Becton Dickinson

Falcon 24-well Kulturplatten, Becton Dickinson

3.2.11. Messung der Rac-Aktivität (“Rac pulldown assay“)

GST-PAK-CD-Fusionsprotein gebunden an Sepharose 4B Banden

Monoklonaler Antikörper gegen Rac, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY

4. Methoden

4.1. Präparation von milde oxidiertem LDL

LDL wurde in Gegenwart von EDTA durch 3 Zentrifugationsschritte aus menschlichem Blut isoliert. EDTA ist ein Komplexbildner, der durch Bindung von Metallionen (z. B. Cu^{2+}) LDL vor oxidativen Prozessen schützt. Um die Salzkonzentration auf physiologische Werte zu reduzieren, wurde die LDL-Fraktion anschließend 36h bei 4°C gegen 15l eines N_2 -gesättigten Puffers (pH 7,4), der 1mM EDTA enthielt, dialysiert. Mox-LDL wurde aus EDTA-freiem LDL durch Oxidation mit 640 μM Kupfersulfat für 20h bei 37°C hergestellt.

4.2. Endothelzellkultur

Endothelzellen wurden durch enzymatische Disaggregation in Anlehnung an die von Jaffe et al. (1973) beschriebene Methode aus Nabelschnüren gewonnen ('human umbilical vein endothelial cells', HUVEC). Anschließend überführte man die Zellsuspension in Plastikkulturflaschen, die zwecks besserer Adhärenz der Endothelzellen, mit Kollagen beschichtet waren (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen G, 24h) und kultivierte sie in Endothelzellwachstumsmedium. Das Wachstumsmedium enthielt Endothelzellsupplement/Heparin und 10% fetales Kälberserum (FKS). Die Zellzahl wurde für alle Experimente auf 2×10^4 Zellen/ cm^2 eingestellt. Man ließ die Endothelzellen 10 Tage zu einem konfluenten Monolayer heranwachsen, wobei alle 2 bis 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

4.3. Isolierung menschlicher Thrombozyten und Messung des "shape change"

Das Blut von gesunden Spendern wurde mit 3,8%iger Trinatrium-Citratlösung antikoaguliert (Volumenanteil 9:1) und anschließend wurde durch Zentrifugation plättchenreiches Plasma gewonnen. Dieses wurde mit ASS (1mM), Apyrase (0,3 U/ml), Zitronensäure (9mM) und EDTA (5mM) behandelt, um eine Aggregation der Thrombozyten zu verhindern. Durch anschließende zweimalige Zentrifugation wurden die Thrombozyten isoliert. Danach wurden sie in HEPES-Puffer resuspendiert (HEPES-Puffer: pH: 7,4, 20 mmol/l HEPES, 138 mmol/l NaCl, 2,9 mmol/l KCL, 1 mmol/l MgCl_2 , 0,6 U/ml Apyrase). Die Messung des "shape change" erfolgte bei einer Zelldichte von $2-4 \times 10^8/\text{ml}$ im Aggregometer durch Messung der Lichttransmission. Dabei kommt es beim "shape change" zu einer Abnahme der Lichttransmission und zum Verlust der Oszillationen. Y-27632 wurde in manchen Experimenten in der jeweils angegebenen Konzentration 30 min vor Stimulation zugegeben. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C. In den Experimenten, in denen C3-Transferase verwendet wurde, wurden die Thrombozyten mit 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ C3-Transferase für 4h bei 37°C vorinkubiert.

4.4. Immunfluoreszenz

Für die Fluoreszenzfärbung von filamentösem Aktin(F-Aktin), ließ man HUVEC 10 Tage auf Kollagen-beschichteten Deckgläsern zu einem konfluenten ‘Monolayer‘ heranwachsen. Nach Stimulation mit mox-LDL, LPA oder S1P fixierte man die Endothelzellen 10min in 3,7%iger Formaldehydlösung(3,7% Formaldehyd in PBS + 1mM Ca²⁺ + 1mM Mg²⁺), permeabilisierte sie 5min in -20°C kaltem Aceton und ließ sie an der Luft trocknen. Danach wurden die Deckgläser 20min mit Rhodamin-Phalloidin(1/20 in PBS) bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet. Das Mowiol enthielt 0,2% p-Phenylenediamin als ‘anti-fading agent‘, um ein Schwächerwerden der Fluoreszenz zu verhindern. Für die Fluoreszenzmikroskopie stand ein Leica RBM 3 Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung, für mikroskopische Bilder wurden Kodak T-Max 400 Filme verwendet.

4.5. Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde mit dem Eppendorf Transjector 5246 und dem Eppendorf Micromanipulator 5171 durchgeführt. Dazu kultivierte man HUVEC wiederum auf Deckgläsern in der oben beschriebenen Weise. Dominant negatives N17rac oder S1P wurden mit Mikroinjektionspuffer verdünnt und in einer Konzentration von 0,1 mg/ml(N17rac), oder 1µM(S1P) in das Zytoplasma der HUVEC injiziert. Als Kontrolle injizierte man Mikroinjektionspuffer allein in die Endothelzellen, was weder die Zellmorphologie noch die Organisation des Aktinzytoskeletts signifikant beeinflusste. Das injizierte Volumen betrug circa $1-3 \times 10^{-15}$ l/Zelle. Injizierte Zellen wurden dadurch identifiziert, daß man Ratten-IgG (5mg/ml) in die Zellen koinjizierte und sie dann mit FITC-konjugiertem anti-Ratten-IgG aus der Ziege färbte. Für jedes Experiment wurden mindestens 100 Zellen injiziert, gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.6. Myosin Leicht Ketten Phosphorylierung

4.6.1. Probengewinnung

HUVEC:

Man ließ HUVEC 10 Tage in Costar 6-well Kulturplatten zu einem konfluenten ‘Monolayer‘ heranwachsen und stimulierte sie dann für bestimmte Zeiten mit mox-LDL (250µg/ml), LPA(1µM) oder S1P(1µM). Anschließend lysierte man die Zellen mit kochendem Laemmli-Puffer, der die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin(je 1µg/ml) enthielt.

Thrombozyten:

Menschliche Thrombozyten wurden in der oben beschriebenen Weise isoliert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen von mox-LDL, LPA oder S1P stimuliert. Die Messung des "shape change" erfolgte in der oben beschriebenen Weise. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots von jeweils 50µl abgenommen, mit jeweils gleichen Mengen von kochendem Laemmli-Puffer, der die gleichen Proteaseinhibitoren - wie oben beschrieben - enthielt, gemischt, 5 Minuten gekocht und dadurch lysiert.

4.6.2. SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über SDS 12,5% Polyacrylamidgelelektrophorese mit diskontinuierlichen Puffersystemen nach Laemmli in der Mini Protean II Elektrophoreseapparat. Es wurden 30µl Probe pro Gelspur geladen. Zur Kontrolle der Proteinauftrennung wurde bei allen Gelen ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker mit Proteinen von bestimmtem Molekulargewicht aufgetragen.

4.6.3. Westernblot

Die aufgetrennten Proteine wurden unter Anwesenheit von Blotting Transfer Puffer mit Hilfe einer Mini Protean II Blot-Apparatur auf Polyvinylidenedifluorid (PVDF)-Membranen transferiert. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurde die Membran für 1h mit TBST-Puffer unter Zusatz von 10% Magermilchpulver geblockt. Nach dreimaligem Waschen (je 5min in TBST) wurde die Membran in TBST mit anti-phospho-MLC-Antikörper der Konzentration 1/1000-1/500 über Nacht inkubiert. Nach drei erneuten Waschschrritten wurde die Membran mit Peroxidase markiertem Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (Amersham) der Konzentration 1/7500 in TBST für 1h inkubiert. Nach wiederum drei Waschschrritten wurde die Membran mit Hilfe des ECL-Western Blotting Detektionssystems entwickelt, die auftretenden Fluoreszenzsignale auf Kodak X-Omat Filme abgebildet. Die Menge an phosphorylierter MLC wurde durch densitometrische Analyse der Proteinbanden, die mit dem anti-phospho-MLC-Antikörper reagierten, unter Verwendung eines Sharp XL-325 Densitometers und Amersham Pharmacia Biotech Image Master Software bestimmt. Phosphorylierte MLC erschien als einzelne Bande bei 20 kDa. Diese 20 kDa-Bande wurde auch von einem monoklonalen Antikörper aus der Maus gegen totale MLC erkannt. Der Linearitätsbereich der densitometrischen Messung der phoshorylierten MLC wurde dadurch bestimmt, daß man Verdünnungsreihen der Proteinproben, die aus der Stimulation der HUVEC mit mox-LDL, LPA oder S1P resultierten, anfertigte(4-40µg Protein/Gelspur).

4.7. Moesin Phosphorylierung in Thrombozyten

Die Probengewinnung erfolgte in der unter 4.6.1. beschriebenen Weise. Die Proteine wurden über SDS 10% PAGE aufgetrennt. Ansonsten wurde der Western Blot wie in der unter 4.6.3. beschriebenen Weise durchgeführt. Als 1. Antikörper wurde anti-phospho-Thr-558-Moesin-Antikörper (1/500), als 2. AK Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (1/3000) verwendet.

4.8. Präparation myosinreicher Endothelzellfraktionen

Man ließ HUVEC 10 Tage auf Kollagen-beschichteten Petrischalen (Ø100mm, Falcon) zu einem konfluenten ‘Monolayer‘ heranwachsen. Nach zweimaligem Waschen mit eiskalter PBS, wurden 200µl Homogenisierungspuffer auf den konfluenten Zellmonolayer gegeben. Anschließend wurden die Zellen 15min bei –80°C inkubiert und dann mit einem Gummistab abgekratzt. Die Zellsuspension wurde homogenisiert, indem man sie 10 x durch eine Insulinspritze saugte. Dann wurde die homogenisierte Suspension in Puffer mit hohem Salzgehalt aufgenommen, 1h bei 4°C inkubiert und anschließend bei 4500g 30min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vom ‘pellet‘, das hauptsächlich aus Zellkernen und Aktin bestand, getrennt, zehnfach mit ‘Assay-Puffer‘ verdünnt und bei 10000g 30min bei 4°C zentrifugiert. Das resultierende myosinreiche ‘pellet‘ wurde in 10µl ‘High Salt‘ -Puffer resuspendiert. In der myosinreichen Zellfraktion war hauptsächlich PP1-Aktivität und kaum PP2-Aktivität vorhanden. Durch Verwendung eines anti-PP1-Antikörpers im Western Blot wurde sichergestellt, daß die myosinreichen Fraktionen gleiche Mengen an PP1 enthielten.

4.9. Messung der Myosin Phosphatase-Aktivität

Für die Messung der Myosin Phosphatase-Aktivität in den myosinreichen Zellfraktionen wurde ein Protein Phosphatase Assay System verwendet, das auf der von Alessi et al. (1992) und Dent et al. (1992) beschriebenen Methode basierte. Phosphorylase b(0,1mM) wurde 1h bei 30°C durch Phosphorylase-Kinase(0,1mg/ml) in vitro phosphoryliert, wobei der Phosphorylierungspuffer 5mCi/ml [γ -³²P]ATP enthielt. Nach Abstoppen der Reaktion durch 90%ige Ammoniumpersulfatlösung (4°C) erfolgte eine einstündige Inkubation auf Eis, an die sich eine 10minütige Zentrifugation bei 12000g anschloß. Nach Resuspension des Proteinpellets und viermaligem Waschen in 45%iger Ammoniumpersulfatlösung wurde durch Aufkonzentrieren in Amicon Centricon-30R Konzentratoren eine finale Proteinkonzentration von 3mg/ml eingestellt. Die Phosphatase-Aktivität wurde durch Messung der Radioaktivitätsfreisetzung der [γ -³²P]Phosphorylase a quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde den myosinreichen Zellfraktionen 30µl ‘Assay Puffer‘ und 20µl des radioaktiven Phosphatasesubstrates zugesetzt.

Die Reaktion wurde nach 10min bei 30°C mit eiskalter 20%er TCA gestoppt. Einer 10minütigen Inkubation auf Eis schloß sich eine 3minütige Zentrifugation bei 12000g an. Die in den Überstand freigesetzte Radioaktivität wurde in einem Wallac 1410 Szintillationszähler gemessen.

4.10. Messung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration

Gewaschene Thrombozyten wurden 45-60min bei 37°C mit FURA-2 AM (4µM) beladen und dann auf eine Zelldichte von 2 x 10⁸/ml eingestellt. Die Ca²⁺-abhängige Fluoreszenz wurde mit einem Spektrofluorimeter gemessen. Dabei lag die Emissionswellenlänge bei 510nm, die Anregungswellenlänge wechselte schnell zwischen 340nm und 380nm. Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wurde durch Anwendung der Gleichung $[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times (S_{f2} / S_{b2})$ quantifiziert.

4.11. Messung der endothelialen Permeabilität anhand des Meerrettichperoxidase-Assays

HUVEC wurden 10 Tage mit 2-tägigem Mediumwechsel auf speziellen mit Kollagen beschichteten Polyethyleneinsätzen kultiviert. Diese Einsätze sind am Boden mit 3 µm großen Poren versehen und wurden in eine Platte, welche mit 24 Versuchseinsätzen ausgestattet ist, eingesetzt. Man gab ins obere Kompartiment 500µl Kulturmedium, welches 250µg/ml mox-LDL enthielt. Nach 2minütiger Stimulation wurde in beiden Kompartimenten das Medium erneuert. In das untere Reaktionsgefäß gab man 500µl neues Kulturmedium und im oberen wurde das mox-LDL/Mediumgemisch durch je 500µl frisches Medium, welches 0,34mg/ml Meerrettichperoxidase enthielt, ersetzt. Die Probengewinnung erfolgte dann nach einer Minute, indem man 60µl aus dem unteren Kompartiment entnahm, mit 860µl Reaktionspuffer und 100µl frischer H₂O₂-Lösung (0,6mM in H₂O) versetzte. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 470 nm.

4.12. Messung der Rac-Aktivität („Rac pulldown assay“)

HUVEC wurden 10 Tage mit 2-tägigem Mediumwechsel in Petrischalen (Ø100mm) kultiviert und dann mit S1P oder LPA stimuliert. Nach Waschen der Zellen mit 4°C kalter PBS wurde 1ml eiskalter Lysepuffer zugegeben, der die Proteaseinhibitoren Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin (je 1µM) enthielt. Anschließend wurden die Zellen abgekratzt und durch Saugen durch Insulinspritzen homogenisiert. Die homogenisierte Suspension wurde dann für 5min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30min bei 4°C mit dem GST-PAK-

CD Fusionsprotein, welches an Sepharose 4B Banden gebunden war, inkubiert. PAK ist ein Effektormolekül von Rac. Danach wurden die Banden 3 x mit Lysepuffer gewaschen. Das an die Banden gebundene Protein wurde dann mit Laemmli Puffer eluiert. Anschließend wurde die Menge von GTP-gebundenem Rac durch Western Blot bestimmt, wobei ein monoklonaler Antikörper gegen Rac verwendet wurde.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisauswertung der Experimente mit Endothelzellen

5.1.1. Erhöhung der endothelialen Permeabilität über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus durch mox-LDL

Wie kürzlich gezeigt wurde, führt die Stimulation der Endothelzellen mit dem bakteriellen Toxin von *Pasteurella multocida* zur Rho/Rho-Kinase abhängigen Endothelzellkontraktion, die wiederum eine erhöhte endotheliale Permeabilität bedingt (Essler et al., 1998). Da bei der milden Oxidation von LDL LPA - ein Aktivator von Rho/Rho-Kinase - gebildet wird, könnte man sich vorstellen, daß auch der mox-LDL-induzierte Anstieg der endothelialen Permeabilität durch Aktivierung von Rho/Rho-Kinase erfolgt. Daher wurde ein "Transwellassay" verwendet, um zu untersuchen, ob eine eventuell erhöhte Permeabilität nach mox-LDL-Stimulation in der Tat auf Aktivierung von Rho/Rho-Kinase zurückzuführen ist. Kontrollendothelzellen oder 24h lang mit 5µg/ml C3 Transferase oder 30min lang mit 10µM des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 vorinkubierte Endothelzellen wurden für 2 Minuten mit mox-LDL stimuliert. Anschließend wurde die transendotheliale Diffusion von Meerrettichperoxidase in einem Transwellssystem gemessen. Wie in Abbildung 10 dargestellt, führt die 2minütige Stimulation mit mox-LDL zu einem deutlichen Anstieg der transendothelialen Diffusion der Meerrettichperoxidase. Die Vorinkubation der Zellen mit C3 Transferase oder Y-27632 dagegen hemmt diesen durch mox-LDL induzierten Anstieg der Permeabilität. Natives LDL hatte keinen Effekt (Abb. 10). Diese Daten deuten darauf hin, daß die durch mox-LDL induzierte Erhöhung der endothelialen Permeabilität über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus erfolgt.

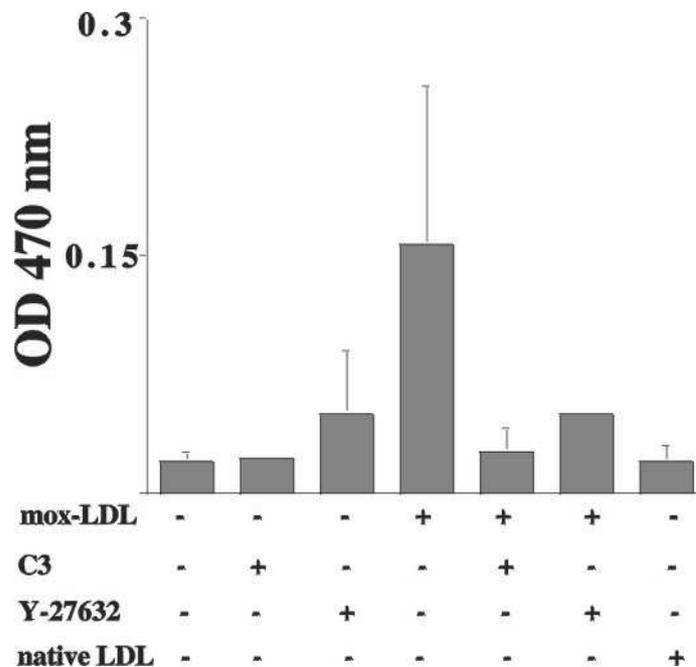


Abb. 10: Mox-LDL steigert die transendotheliale Diffusion von Meerrettichperoxidase über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus.

HUVEC wurden entweder allein, sprich ohne Zusatz inkubiert oder 24h lang mit 5µg/ml C3 Transferase (C3) oder 30min lang mit 10µM des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632. Dann wurden sie 2min lang mit 250µg/ml mox-LDL oder mit 250 µg/ml nativem LDL als Kontrolle stimuliert. Die transendotheliale Diffusion von Meerrettichperoxidase wurde dann wie unter Methoden beschrieben spektrophotometrisch bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von 5-8 Messungen.

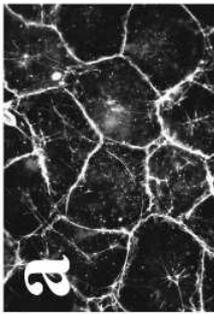
5.1.2. Vergleich der morphologischen Veränderungen nach Stimulation mit mox-LDL, LPA und S1P im Zeitverlauf

Mox-LDL und LPA führen zur Endothelzellkontraktion und Aktinstrebfaserbildung nach 1-2minütiger Stimulation.

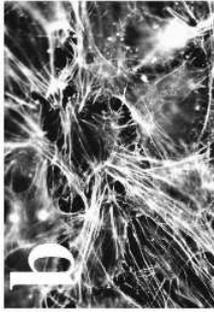
S1P induziert die Bildung von ‘membrane ruffles‘ nach 1-2minütiger Stimulation, nach 5-15minütiger Stimulation mit S1P kommt es zur Bildung von Aktinstrebfasern.

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben induziert mox-LDL einen Anstieg der endothelialen Permeabilität über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase. Es ist bekannt, daß ein Anstieg der endothelialen Permeabilität durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts bedingt ist. Um die Effekte von mox-LDL, LPA und S1P - einem strukturell und funktionell mit LPA verwandten Agonisten - auf das Aktinzytoskelett humaner Endothelzellen zu charakterisieren, wurden HUVEC unterschiedlich lang mit mox-LDL (250µg/ml), LPA (1µM) oder S1P (1µM) stimuliert. Anschließend wurde F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt. Wie in Abbildung 11 dargestellt sind unstimulierte Kontrollzellen ausgebreitet, sie zeigen einen peripheren Aktinring an den Zellgrenzen und kaum Strebfasern (Abb.11.1.a, 11.2.a, 11.3.a). Nach Stimulation der Endothelzellen mit mox-LDL (250µg/ml) oder LPA (1µM) für 1-2min kommt es zur Abrundung/Kontraktion der Endothelzellen, Ausbildung von Aktinstrebfasern (gebündelte Aktinfilamente) und Lücken zwischen den Zellen (Abb.11.1.b, 11.2.b). Nach 5-15minütiger Stimulation mit mox-LDL oder LPA kommt es zur allmählichen Rückbildung der Strebfasern, die interzellulären Lücken verschwinden und die Zellen breiten sich wieder aus (Abb.11.1.c,d; Abb.11.2.c,d). Zur Kontrolle wurden die Endothelzellen mit nativem LDL stimuliert (Abb. 11.1.e). Dabei bleiben die Zellen ausgebreitet, es kommt nicht zur Endothelzellkontraktion oder zur Ausbildung von Aktinstrebfasern. Nach Stimulation der Endothelzellen mit S1P (1µM) für 0,5-1min kommt es ebenfalls zur Kontraktion der Endothelzellen und Ausbildung von Aktinstrebfasern (Abb.11.3.b). Die 1-2minütige Stimulation der Endothelzellen mit S1P dagegen führt zur Ausbildung sogenannter ‘membrane ruffles‘. Darunter versteht man Verdichtungen des Aktinzytoskeletts entlang der Plasmamembran oder Ausstülpungen der Plasmamembran; es kommt nicht zur Bildung von Aktinstrebfasern (Abb.11.3.c). Nach 5minütiger Stimulation mit S1P bilden sich die ‘membrane ruffles‘ allmählich zurück, es treten vereinzelt wieder Aktinstrebfasern auf (Abb.11.3.d). Nach 15minütiger Stimulation mit S1P sind die ‘membrane ruffles‘ fast vollständig zurückgebildet (Abb.11.3.e).

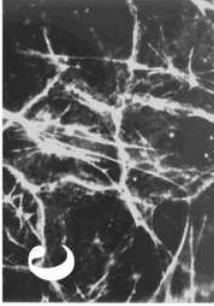
Abb. 11.1.



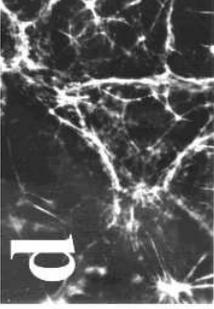
a: unstimulierte Kontrollzellen



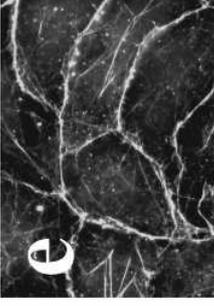
b: mit mox-LDL (250 µg/ml)
1-2min lang stimulierte Zellen



c: mit mox-LDL (250 µg/ml)
5min lang stimulierte Zellen

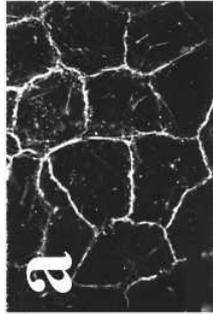


d: mit mox-LDL (250 µg/ml)
15min lang stimulierte Zellen

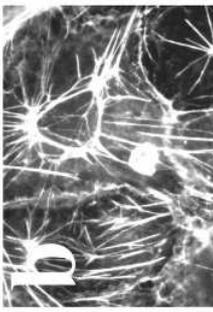


e: mit nativem LDL (250 µg/ml)
1-2min lang stimulierte Zellen

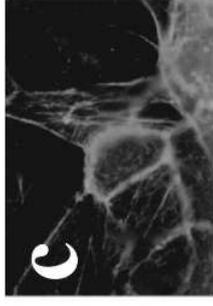
Abb. 11.2.



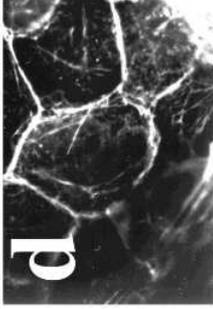
a: unstimulierte Kontrollzellen



b: mit LPA (1 µM)
1-2min lang stimulierte Zellen

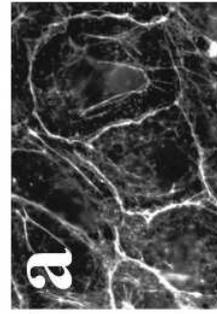


c: mit LPA (1 µM)
5min lang stimulierte Zellen



d: mit LPA (1 µM)
15min lang stimulierte Zellen

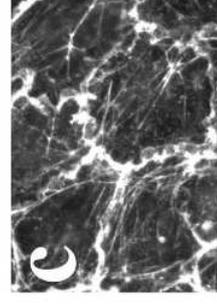
Abb. 11.3.



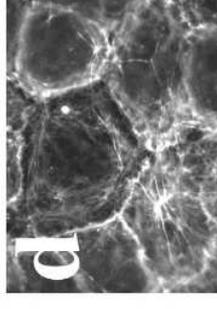
a: unstimulierte Kontrollzellen



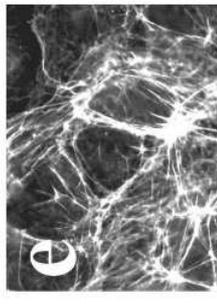
b: mit S1P (1 µM)
0,5-1min lang stimulierte Zellen



c: mit S1P (1 µM)
1-2min lang stimulierte Zellen



d: mit S1P (1 µM)
5min lang stimulierte Zellen



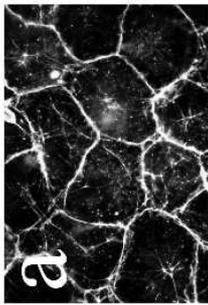
e: mit S1P (1 µM)
15min lang stimulierte Zellen

Abb. 11: Mox-LDL, LPA und S1P führen zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Vergleich der morphologischen Veränderungen im Zeitverlauf nach Stimulation mit mox-LDL, LPA oder S1P.

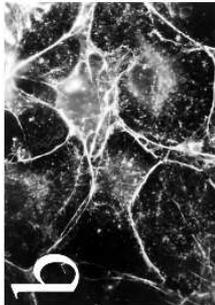
5.1.3. Endothelzellkontraktion und Aktinstreßfaserbildung sind Rho/Rho-Kinase abhängig, die Bildung der “membrane ruffles“ ist Rho/Rho -Kinase unabhängig

Es stellte sich die Frage, ob die nach 1-2minütiger mox-LDL/LPA-Stimulation oder 0,5-1minütiger bzw. 5-15minütiger S1P-Stimulation induzierte Aktinstreßfaserbildung über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus erfolgt. Deshalb wurden die Effekte von mox-LDL, LPA und S1P auf das Aktinzytoskelett der Endothelzellen nach Hemmung von Rho bzw. Rho-Kinase untersucht. Um Rho zu inaktivieren, wurden die Endothelzellen 24h lang mit dem selektiven Rho-Inhibitor C3 Transferase aus *Clostridium botulinum* (5µg/ml), der Rho durch ADP-Ribosylierung am Asparagin in Position 41 des Rho-Proteins irreversibel hemmt, inkubiert. Für die Hemmung der Rho-Kinase wurde der spezifische Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (30min, 10µM), der durch Bindung an die katalytische Untereinheit die Rho-Kinase spezifisch hemmt, verwendet. Anschließend wurden die Zellen 1-2min mit mox-LDL bzw. LPA oder 0,5-1min, 1-2min bzw. 15min mit S1P stimuliert. Abbildung 12.1.a zeigt unstimulierte Kontrollzellen. Die in Abbildung 12.1.b und c gezeigten nur mit C3 Transferase (24h, 5µg/ml) oder Y-27632 (30min, 10µM) behandelten Zellen ähneln unstimulierten Kontrollzellen. Das bedeutet, daß C3 Transferase oder Y-27632 die Aktinverteilung in unstimulierten Endothelzellen nicht beeinflussen. Dagegen führt die Vorbehandlung der Zellen mit C3 Transferase oder Y-27632 zur kompletten Hemmung der durch mox-LDL (Abb.12.2.a,b,c) oder LPA (Abb.12.3.a,b,c) oder S1P (Abb.12.4.a,b,c, Abb.12.6.a,b,c) induzierten Aktinstreßfaserbildung und Endothelzellkontraktion. Dies deutet darauf hin, daß mox-LDL, LPA und S1P die Aktinstreßfaserbildung und Endothelzellkontraktion über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus bewirken. Die durch S1P induzierten “membrane ruffles“ werden dagegen durch C3 Transferase oder Y-27632 nicht gehemmt (Abb.12.5.a,b,c), was wiederum bedeutet, daß ihre Bildung Rho/Rho-Kinase unabhängig erfolgt. Da andere Arbeitsgruppen bereits gezeigt haben, daß die Bildung von “membrane ruffles“ über die Aktivierung der kleinen GTPase Rac erfolgt (Ridley et al., 1992; Hall, 1998) wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die durch S1P induzierte Bildung der “membrane ruffles“ über einen Rac abhängigen Mechanismus erfolgt.

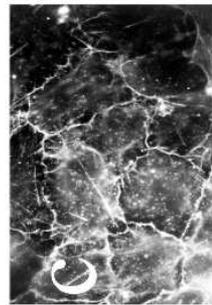
Abb. 12.1.



a: unstimulierte Kontrollzellen

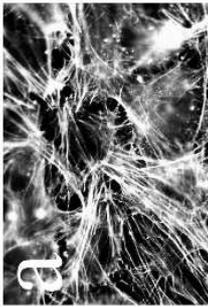


b: C3 Transferase (24h, 5 µg/ml)

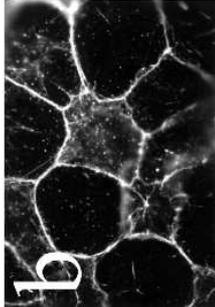


c: Y-27632 (30min, 10 µM)

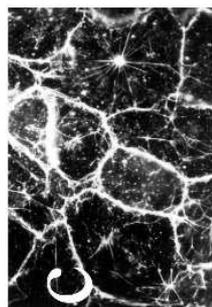
Abb. 12.2.



a: mox-LDL (1-2min, 250 µg/ml)

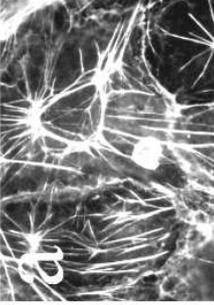


b: C3 Transferase (24h, 5 µg/ml)
+ mox-LDL (1-2min, 250 µg/ml)

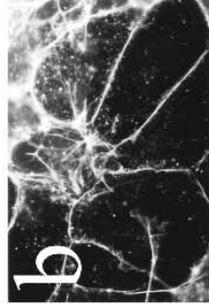


c: Y-27632 (30min, 10 µM)
+ mox-LDL (1-2min, 250 µg/ml)

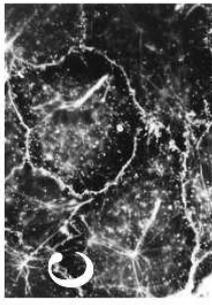
Abb. 12.3.



a: LPA (1-2min, 1 µM)



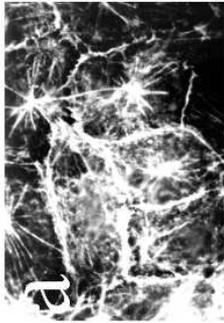
b: C3 Transferase (24h, 5 µg/ml)
+ LPA (1-2min, 1 µM)



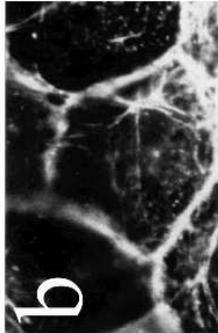
c: Y-27632 (30min, 10 µM)
+ LPA (1-2min, 1 µM)

Abb. 12: Die durch mox-LDL, LPA und SIP induzierte Bildung der Aktinstreifasern erfolgt über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus. Die durch SIP induzierten "membrane ruffles" sind Rho/Rho-Kinase unabhängig.

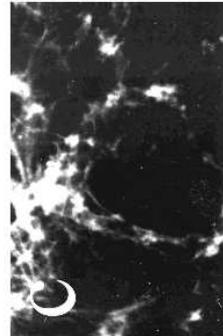
Abb. 12.4.



a: SIP (0,5-1min, 1µM)

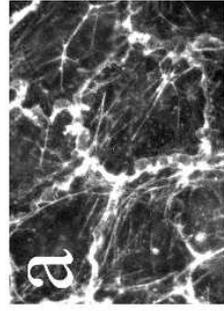


b: C3 Transferase (24h, 5µg/ml)
+ SIP (0,5-1min, 1µM)

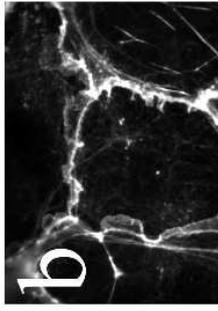


c: Y-27632 (30min, 10µM)
+ SIP (0,5-1min, 1µM)

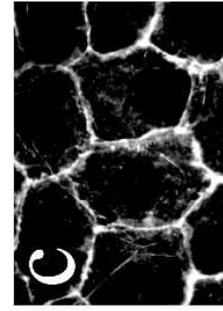
Abb. 12.5.



a: SIP (1-2min, 1µM)

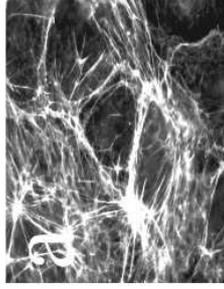


b: C3 Transferase (24h, 5µg/ml)
+ SIP (1-2min, 1µM)

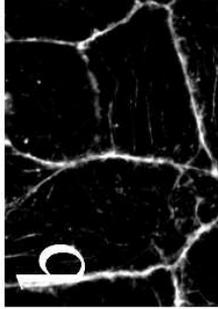


c: Y-27632 (30min, 10µM)
+ SIP (1-2min, 1µM)

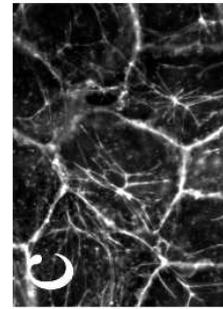
Abb. 12.6.



a: SIP (15min, 1µM)



b: C3 Transferase (24h, 5µg/ml)
+ SIP (15min, 1µM)



c: Y-27632 (30min, 10µM)
+ SIP (15min, 1µM)

Abb. 12: Die durch mox-LDL, LPA und SIP induzierte Bildung der Aktinstreifasern erfolgt über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus. Die durch SIP induzierten "membrane ruffles" sind Rho/Rho-Kinase unabhängig.

5.1.4. Bildung der durch S1P induzierten ‘membrane ruffles‘ durch Aktivierung von Rac

Diese Hypothese wird durch die in den folgenden 3 Unterkapiteln beschriebenen Ergebnisse belegt.

5.1.4.1. Mikroinjektion von dominant negativem N17Rac hemmt die durch S1P induzierte Bildung der ‘membrane ruffles‘

Um zu untersuchen, ob die durch 1-2minütige Stimulation mit S1P induzierte Bildung der ‘membrane ruffles‘ in Endothelzellen über einen Rac abhängigen Mechanismus erfolgt, wurde eine dominant negative Rac-Mutante, N17Rac, in Endothelzellen mikroinjiziert. Anschließend wurde mit S1P stimuliert. Wie in Abbildung 13 dargestellt hemmt die Mikroinjektion von dominant hemmendem N17Rac die Ausbildung der ‘membrane ruffles‘ (mikroinjizierte Zellen sind mit Sternen markiert). Dies weist darauf hin, daß die durch S1P induzierte Bildung der ‘membrane ruffles‘ in Endothelzellen über einen Rac abhängigen Mechanismus erfolgt.

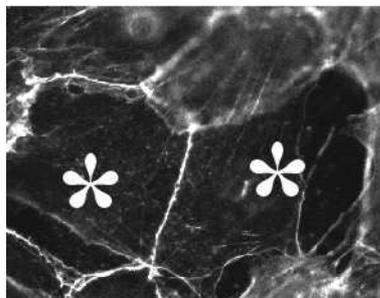


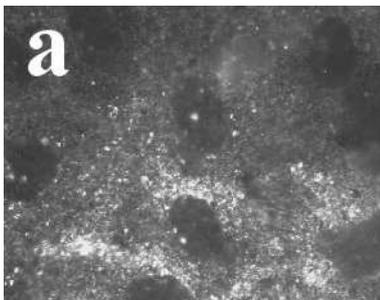
Abb. 13: Die durch S1P (2min, 1 μ M) induzierten ‘membrane ruffles‘ werden durch Mikroinjektion von dominant negativem N17Rac gehemmt.

Die mikroinjizierten Zellen sind mit Sternen (*) gekennzeichnet.

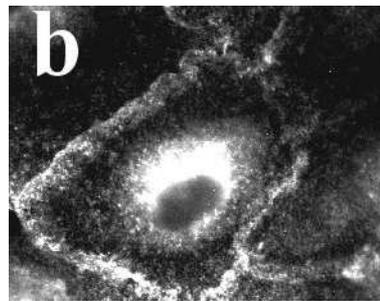
5.1.4.2. Durch S1P aktiviertes Rac transloziert nach 1-2minütiger Stimulation aus dem Zytosol an die peripheren Membranen

Aktivierte Rho GTPasen translozieren aus dem Zytosol an periphere Membranen (Hall, 1998). Um die durch S1P induzierte Rac-Aktivierung weiter zu belegen, wurde mittels Im-

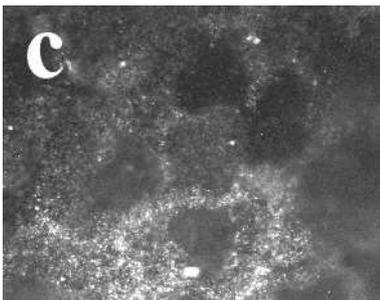
munfluoreszenz-Mikroskopie untersucht, ob eine solche Rac Translokation nach Stimulation mit S1P stattfindet. Zur Immunfärbung von Rac wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet. Abbildung 14a zeigt, daß in unstimulierten HUVEC Rac im Zytosol lokalisiert ist. Nach 1-2minütiger Stimulation mit S1P transloziert Rac an die peripheren Membranen (Abb.14b), nach 5-15minütiger Stimulation kehrt es wieder zurück ins Zytosol (Abb.14c und d). Dieser "shift" von Rac an die peripheren Membranen deutet auf eine Aktivierung von Rac nach 1 - 2minütiger Stimulation mit S1P hin. Um die Aktivierung von Rac durch S1P weiter zu untersuchen, wurde die Rac-Aktivität direkt gemessen.



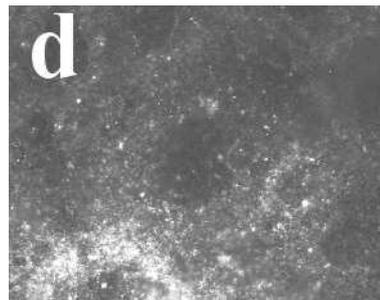
a: unstimulierte Kontrollzellen



b: mit S1P (1µM) 1-2min lang stimulierte Zellen



c: mit S1P (1µM) 5min lang stimulierte Zellen



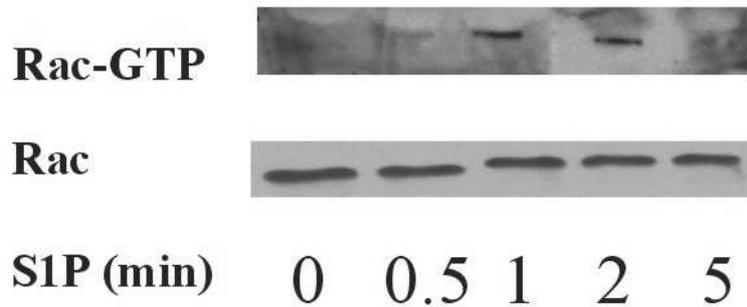
d: mit S1P (1µM) 15min lang stimulierte Zellen

Abb. 14: Durch S1P aktiviertes Rac transloziert nach 1-2minütiger Stimulation aus dem Zytosol an die peripheren Membranen.

5.1.4.3. Erhöhung der Rac-Aktivität im ‘Rac pulldown assay‘ nach 1 -2minütiger Stimulation mit S1P

Zur Messung von Rac-Aktivität wurden ‘pulldown assays‘ verwendet. Dazu wird die CRIB-Domäne des Rac-Effektormoleküls PAK als GST-Fusionsprotein (GST-PAK-CD-Fusionsprotein) verwendet (Tapon und Hall, 1997). Dieses Konstrukt interagiert mit GTP-gebundenem Rac und Cdc42. Die Menge von aktivem (GTP-gebundenem) Rac, welches an GST-PAK-CD bindet, kann durch Western Blot bestimmt werden und spiegelt den Grad der Rac-Aktivität wieder. Wie in Abbildung 15 dargestellt ist, konnte in Kontrollzellen kaum basale Rac-Aktivität nachgewiesen werden. S1P führt nach 1-2minütiger Stimulation zur Erhöhung der Rac-Aktivität, die dann nach 5minütiger S1P-Stimulation wieder auf basale Werte sinkt (Abb. 15a). Im Gegensatz zu S1P führt LPA nicht zur Aktivierung von Rac in HUVEC (Abb. 15b). Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß S1P-Stimulation in Endothelzellen zur transienten Aktivierung von Rac führt. Parallel dazu kommt es – wie im vorigen Kapitel beschrieben – zur Bildung von ‘membrane ruffles‘:

a



b

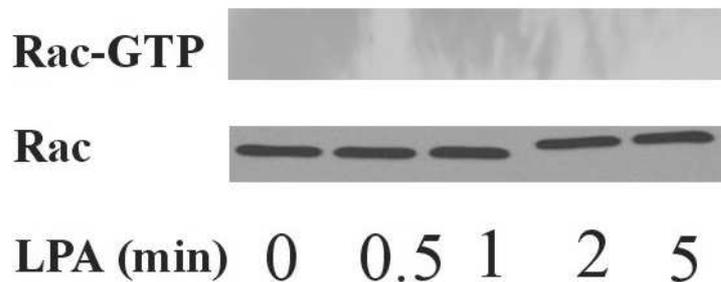


Abb. 15: S1P aktiviert Rac in HUVEC.

HUVEC wurden unterschiedlich lang (0, 0.5, 1 und 2min) mit S1P (1 μ M) oder LPA (1 μ M) stimuliert. Die Rac-Aktivität wurde dann im Rac ‘pull-down assay‘ gemessen. S1P aktiviert Rac nach 1-2minütiger Stimulation (Abb. 15a), wohingegen LPA Rac nicht aktiviert (Abb. 15b).

5.1.5. “Downregulation“ der MLC -Phosphatase zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch mox-LDL, LPA und S1P

Durch Aktivierung von Rho/Rho-Kinase induzieren mox-LDL, LPA und S1P Aktinstreißfasern in Endothelzellen. Der Streißfaserbildung liegt folgender biochemischer Mechanismus zugrunde: Rho aktiviert Rho-Kinase. Diese wiederum phosphoryliert und inaktiviert die MLC-Phosphatase. Inaktivierung der MLC-Phosphatase führt zu verstärkter Myosin Leichtketten-Phosphorylierung, die Interaktion zwischen Aktin- und Myosinfilamenten ermöglicht. Diese Interaktion führt zur Bildung von Streißfasern. Der Hemmung der MLC-Phosphatase könnte also eine Schlüsselrolle bei der mox-LDL-induzierten endothelialen Dysfunktion zukommen. Deshalb stellte sich die Frage, ob die Stimulation der Endothelzellen mit mox-LDL, LPA oder S1P zur Inaktivierung der MLC-Phosphatase führt. Um diese Frage zu beantworten, wurde die MLC-Phosphatase-Aktivität in Endothelzellen wie unter Material und Methoden beschrieben nach Stimulation der HUVEC mit mox-LDL (250µg/ml), LPA (1µM) oder S1P (1µM) gemessen und die Zeitverläufe miteinander verglichen. Wie in Abbildung 16a dargestellt, sinkt die MLC-Phosphatase-Aktivität nach mox-LDL-Stimulation innerhalb von 30s-2min schnell auf ca. 60% der basalen Phosphatase-Aktivität ab und kehrt nach ca. 5min wieder auf den Ausgangswert zurück. Nach Stimulation mit LPA sinkt die MLC-Phosphatase-Aktivität innerhalb von 30s(-1,5-2min) schnell auf ca. 45% der basalen Phosphatase-Aktivität ab und kehrt auch innerhalb von ca. 5min wieder auf den basalen Ausgangswert zurück (Abb. 16b). Interessanterweise, zeigt sich nach Stimulation mit S1P ein anderer Zeitverlauf der Phosphatase-Inaktivierung. Wie in Abbildung 16c dargestellt, inaktiviert S1P die MLC-Phosphatase nach 30sekündiger Stimulation, wobei die Phosphatase-Aktivität auf ca. 55% der basalen Phosphatase-Aktivität absinkt. Nach 1-2minütiger S1P-Stimulation kehrt die Phosphatase-Aktivität vorübergehend wieder auf basale Ausgangswerte zurück. Nach 5minütiger Stimulation mit S1P wird die Phosphatase erneut “downreguliert“, sie sinkt auf ca. 30% der basalen Phosphatase-Aktivität ab; diese “Downregulation“ der Phosphatase besteht für mindestens 15 min. Diese Daten zeigen, daß mox-LDL, LPA und S1P die MLC-Phosphatase zu unterschiedlichen Zeitpunkten “downregulieren“. Das deutet darauf hin, daß mox-LDL, LPA und S1P wahrscheinlich die kleine GTPase Rho aktivieren, die wiederum die Rho-Kinase aktiviert, die ihrerseits die MLC-Phosphatase inaktiviert. Es stellte sich nun die Frage, ob die “Downregulation“ der MLC -Phosphatase zur erhöhten Phosphorylierung der Myosin Leicht Kette führt, was die Interaktion des Myosins mit F-Akinfilamenten in Aktinstreißfasern fördert.

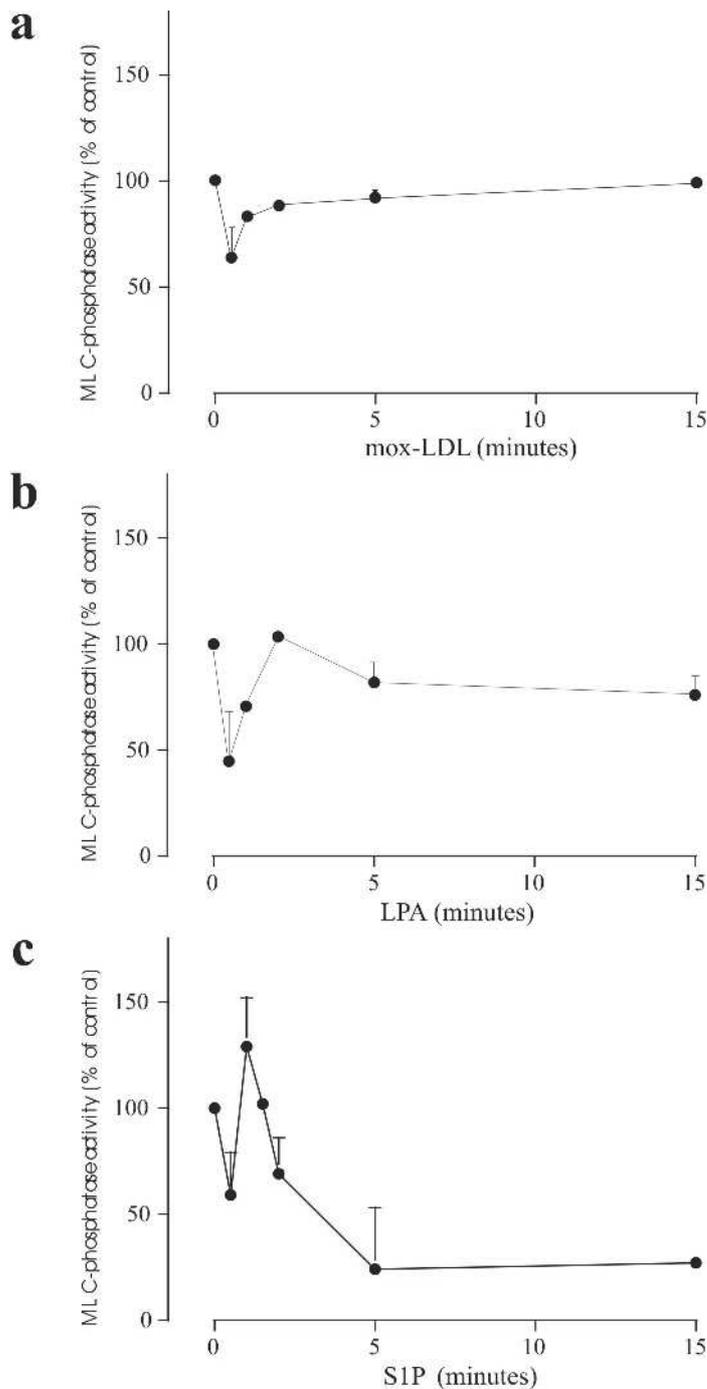


Abb. 16: Mox-LDL, LPA und S1P führen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zur Inaktivierung der MLC-Phosphatase. Vergleich der durch mox-LDL, LPA und S1P induzierten Veränderungen der MLC-Phosphatase-Aktivität in HUVEC im Zeitverlauf.

Die MLC-Phosphatase-Aktivität wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in HUVEC gemessen:

a: nach Stimulation mit mox-LDL (250µg/ml)

b: nach Stimulation mit LPA (1µM)

c: nach Stimulation mit S1P (1µM)

Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3-4 Experimenten.

5.1.6. Steigerung der MLC-Phosphorylierung über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch mox-LDL, LPA und S1P

Um zu untersuchen, ob die durch mox-LDL, LPA und S1P bedingte ‘Downregulation‘ der MLC-Phosphatase-Aktivität zur erhöhten MLC-Phosphorylierung führt, wurde die MLC-Phosphorylierung in HUVEC nach Stimulation mit mox-LDL, LPA oder S1P gemessen und die Zeitverläufe miteinander verglichen. Die MLC-Phosphorylierung wurde mit Hilfe von Western Blots bestimmt, wobei ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte MLC verwendet wurde. Dieser Antikörper reagiert nur mit der phosphorylierten MLC, nicht mit der unphosphorylierten. Wie in Abbildung 17a dargestellt, steigt die MLC-Phosphorylierung durch mox-LDL-Stimulation innerhalb von 1-2min auf einen Gipfelwert und kehrt dann innerhalb von 5-15min wieder auf den Ausgangswert zurück. Nach Stimulation mit LPA ergibt sich ein ähnlicher Zeitverlauf der MLC-Phosphorylierung. Sie steigt innerhalb von 1-2min auf einen Gipfelwert und kehrt dann innerhalb von 5min wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb. 17b). Interessanterweise ergibt sich nach Stimulation der Endothelzellen mit S1P ein anderer Zeitverlauf der MLC-Phosphorylierung, nämlich eine biphasische Kurve. Die MLC-Phosphorylierung steigt nach S1P-Stimulation innerhalb von 0,5-1min auf ein Maximum an. Anschließend wird die phosphorylierte MLC innerhalb von 1-2min nach S1P-Stimulation wieder teilweise dephosphoryliert. Darauf folgt nach ca. 5minütiger S1P-Stimulation ein erneuter Anstieg der MLC-Phosphorylierung, der mindestens 15min anhält. Da die Zeitverläufe der MLC-Phosphorylierung die Zeitverläufe der MLC-Phosphatase-Aktivität widerspiegeln, kann man daraus folgern, daß die ‘Downregulation‘ der MLC -Phosphatase wahrscheinlich die erhöhte MLC-Phosphorylierung bewirkt. Weiterhin stellte sich die Frage, ob dieser Signalweg durch Aktivierung von Rho und Rho-Kinase bedingt ist. Es wurde also untersucht, ob sich die MLC-Phosphorylierung durch Hemmung von Rho oder Rho-Kinase hemmen läßt. Dazu wurden HUVEC mit dem spezifischen Rho-Inhibitor C3 Transferase (24h, 5µg/ml) oder mit dem selektiven Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (30min, 10µM) inkubiert und dann für die angegebenen Zeitspannen mit mox-LDL, LPA oder S1P stimuliert. Wie in Abbildung 18 dargestellt, blockiert die Hemmung von Rho oder Rho-Kinase (fast) vollständig die durch mox-LDL, LPA oder S1P induzierte MLC-Phosphorylierung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß mox-LDL, LPA und S1P die MLC-Phosphorylierung über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus steigern.

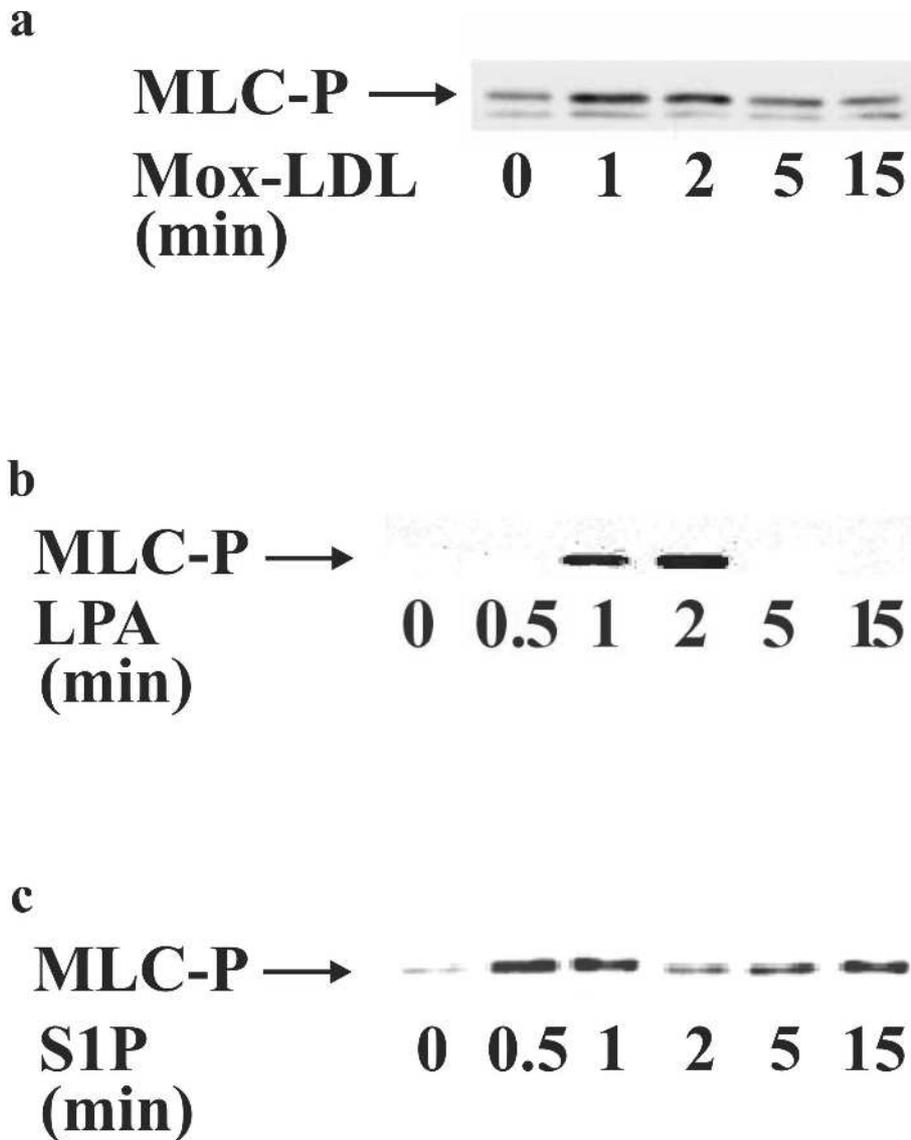


Abb. 17: Mox-LDL, LPA und S1P steigern die MLC-Phosphorylierung in HUVEC zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Vergleich der Zeitverläufe.

HUVEC wurden für die angegebenen Zeitspannen mit mox-LDL (250 μ g/ml) (a), LPA (1 μ M) (b) oder S1P (1 μ M) (c) stimuliert. Die MLC-Phosphorylierung wurde im Westernblot bestimmt, wobei ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte MLC verwendet wurde. Es ist jeweils ein Westernblot gezeigt, der repräsentativ ist für 3 ähnliche Experimente. Die 2. Bande mit niedrigerem Molekulargewicht in Abb. 17a ist durch eine unspezifische Kreuzreaktion mit dem 2. Antikörper bedingt.

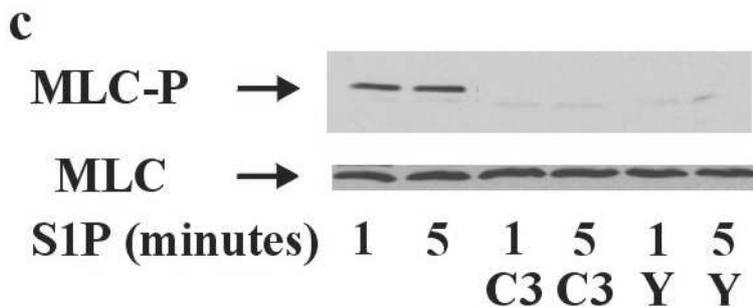
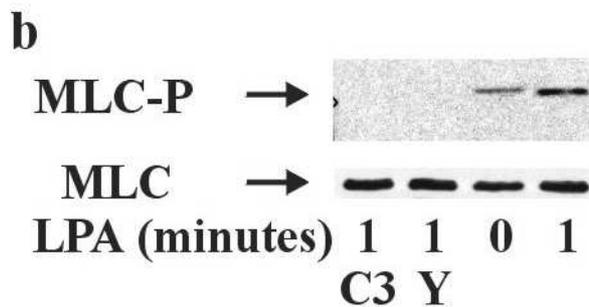
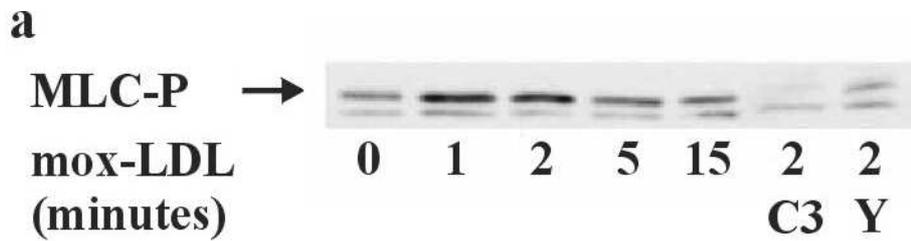
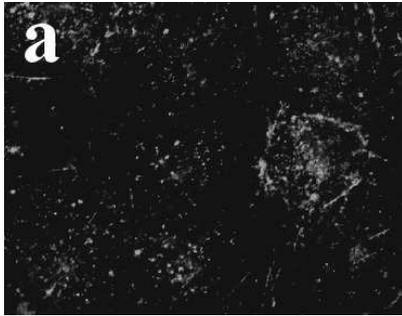


Abb. 18: Mox-LDL, LPA und S1P steigern die MLC-Phosphorylierung in HUVEC über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus.

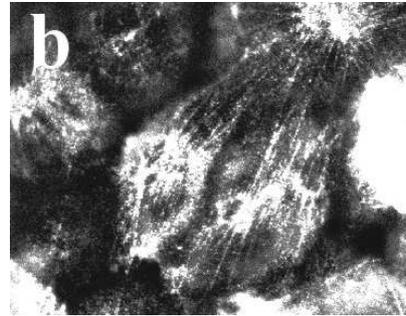
Nach Vorinkubation der HUVEC mit C3 Transferase (24h, 5µg/ml) oder Y-27632 (30min, 10µM) wurden sie jeweils für die angegebenen Zeitspannen mit mox-LDL (250µg/ml) (a), LPA (1µM) (b) oder S1P (1µM) (c) stimuliert. In a ist ein Westernblot gezeigt, der repräsentativ ist für 3 ähnliche Experimente, in b und c sind jeweils 2 Westernblots gezeigt, die auch repräsentativ sind für jeweils 3 ähnliche Experimente. Dabei zeigt der 2. Westernblot in b und c die totale MLC, deren Menge sich im Zeitverlauf nicht ändert.

5.1.7. Einbau der phosphorylierten Myosin Leicht Kette in Aktinstreißfasern durch mox-LDL

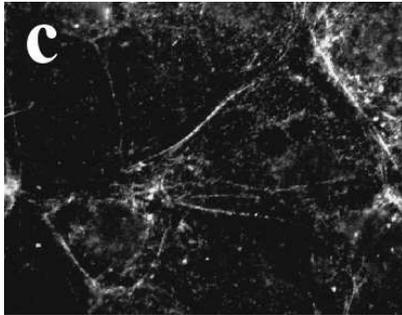
Die Phosphorylierung der Myosin Leicht Kette ermöglicht dem Myosin mit F-Aktinfilamenten in Aktinstreißfasern zu interagieren und dadurch kontraktile Vorgänge in Endothelzellen auszulösen. Um die intrazelluläre Verteilung der phospho-MLC in HUVEC zu untersuchen, wurden die Zellen mit mox-LDL stimuliert, fixiert, und im Anschluß wurde die phosphorylierte MLC mittels des oben beschriebenen Antikörpers immungefärbt. Abbildung 19a zeigt, daß in unstimulierten Kontrollzellen fast keine phosphorylierte MLC nachgewiesen werden kann. Dagegen führt die 1-2minütige Stimulation der Endothelzellen mit mox-LDL zum Einbau der phosphorylierten MLC in Aktinstreißfasern (Abb. 19b). In Endothelzellen, die mit C3 Transferase oder Y-27632 vorbehandelt wurden, war fast keine phosphorylierte MLC und damit waren auch fast keine Aktinstreißfasern nachweisbar (Abb. 19c und d). Außerdem waren in Endothelzellen, die mit nativem LDL (1-2min, 250µg/ml) als Kontrolle stimuliert wurden, kaum phosphorylierte MLC und damit kaum Aktinstreißfasern nachweisbar (Abb. 19e).



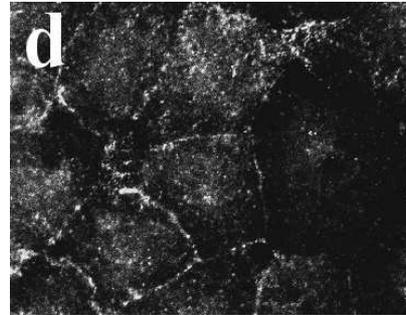
a: unstimulierte Kontrollzellen



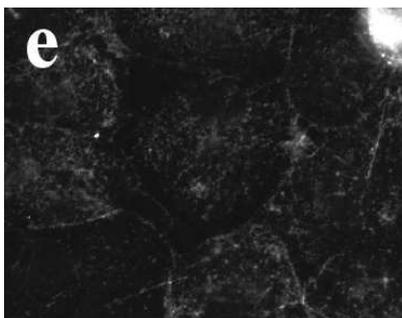
b: mit mox-LDL (1-2min, 250µg/ml) stimulierte Zellen



c: mit C3 Transferase (24h, 5µg/ml) vorbehandelte und dann mit mox-LDL stimulierte Zellen



d: mit Y-27632 (30min, 10µM) vorbehandelte und dann mit mox-LDL stimulierte Zellen



e: mit nativem LDL (1-2min, 250µg/ml) stimulierte Zellen

Abb. 19: Mox-LDL führt zum Einbau der phosphorylierten MLC in Aktinstreißfasern.

Nach Stimulation der Zellen wurden sie fixiert und es wurde die phosphorylierte MLC angefärbt.

5.2. Ergebnisauswertung der Experimente mit Thrombozyten

5.2.1 Mox-LDL und LPA induzieren über einen Rho-Kinase abhängigen Mechanismus den ‘shape change‘ der Thrombozyten

Der ‘shape change‘ der Thrombozyten stellt die früheste Phase der Plättchenaktivierung nach Stimulation mit physiologischen Agonisten wie z. B. Thrombin oder ADP dar und geht damit der Aggregation und Sekretion der Thrombozyten voraus. Beim ‘shape change‘ kommt es zur Kontraktion der Plättchen, sie gehen aus der diskoiden in die runde Form über und es erfolgt die Ausbildung von Pseudopodien. Der ‘shape change‘ ist also ein kontraktile Vorgang, der durch Phosphorylierung der Myosin Leicht Kette ausgelöst wird. Kürzlich wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, daß die MLC-Phosphorylierung und der ‘shape change‘ in Thrombozyten durch zwei Signalwege reguliert werden: durch die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Myosin Leicht Ketten Kinase (MLKK) und durch die Rho-Kinase. Jeder dieser beiden Signalwege kann unabhängig vom anderen aktiviert werden, abhängig vom Typ und der Konzentration des Plättchenagonisten. Nach Aktivierung von Rho aktiviert Rho sein Effektormolekül, die Rho-Kinase. Die Rho-Kinase wiederum phosphoryliert die MLC-Phosphatase, die sie dadurch inaktiviert, oder sie phosphoryliert die MLC direkt (Amano et al., 1996). Die erhöhte MLC-Phosphorylierung führt dann zum ‘shape change‘. Seit einiger Zeit weiß man, daß LPA die Thrombozyten-aktivierende Substanz im mox-LDL ist (Siess et al., 1999). Es stellte sich nun die Frage, über welchen Signalweg mox-LDL und LPA die MLC-Phosphorylierung und den ‘shape change‘ der Thrombozyten induzieren: über Rho/Rho -Kinase oder über die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige MLKK? Deshalb wurden Thrombozyten 30min lang mit verschiedenen Konzentrationen des selektiven Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 inkubiert und dann mit mox-LDL (10-40 μ g/ml) bzw. LPA (20-40nM) stimuliert. Der ‘shape change‘ wurde im Aggregometer gemessen. Abbildung 20a zeigt, daß Y-27632 in einer Konzentration von 5 μ M oder höher den durch mox-LDL induzierten ‘shape change‘ signifikant reduziert und daß 40 μ M von Y-27632 eine komplette Hemmung des durch mox-LDL induzierten ‘shape change‘ bewirken. Wie in Abbildung 20b dargestellt, führt Y-27632 schon in einer Konzentration von 0,1-1 μ M zu einer deutlichen Reduktion des durch LPA induzierten ‘shape change‘ und bewirkt in einer Konzentration von 40 μ M wiederum die komplette Hemmung des ‘shape change‘. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß mox-LDL und LPA den ‘shape change‘ der Thrombozyten über die Aktivierung der Rho-Kinase induzieren.

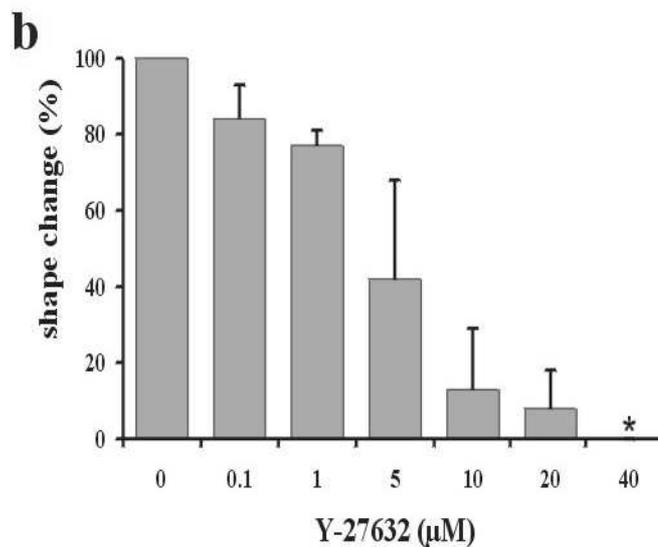
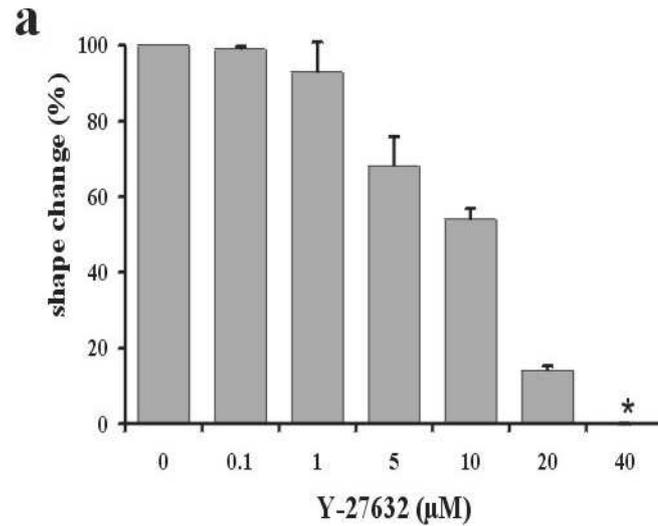


Abb. 20: Mox-LDL und LPA induzieren über einen Rho-Kinase abhängigen Mechanismus den ‘shape change‘ der Thrombozyten.

Gewaschene Plättchensuspensionen wurden 30min lang mit den angegebenen Konzentrationen von Y-27632 in Aggregometerküvetten inkubiert und dann mit mox-LDL (10-40µg/ml) (a) oder LPA (20-40nM) (b) stimuliert. Es sind Prozentwerte des maximalen ‘shape change‘, den man mit mox-LDL (10-40µg/ml) bzw. LPA (20-40nM) in Abwesenheit von Y-27632 auslösen kann, angegeben. Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 6 Experimenten.

5.2.2. Steigerung der MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase durch mox-LDL und LPA

Im folgenden Unterkapitel wird die durch mox-LDL und LPA induzierte MLC-Phosphorylierung im Zeitverlauf verglichen.

Es ist schon seit langer Zeit bekannt, daß die MLC-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Auslösung des "shape change" spielt (Daniel et al., 1984). Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung in der Myosin Leicht Kette, die die Voraussetzung für die Aktin-Myosin-Interaktion und Zellkontraktion darstellt. Es war deshalb interessant zu untersuchen, ob mox-LDL bzw. LPA die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten steigern und worin die Ähnlichkeiten und Unterschiede im jeweiligen Zeitverlauf der MLC-Phosphorylierung bestehen. Um diese Fragen zu beantworten, wurden nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL (10-40µg/ml) bzw. LPA (20-40nM) Westernblots angefertigt, wobei ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte MLC verwendet wurde. Die Abbildungen 21 und 22 zeigen, daß die MLC-Phosphorylierung in unstimulierten Thrombozyten sehr gering ist. Nach Stimulation mit mox-LDL steigt die MLC-Phosphorylierung innerhalb von 20s auf das ca. 18fache des Ausgangswertes an (Abb. 21a). Nach 40-60sekündiger mox-LDL-Stimulation sinkt die MLC-Phosphorylierung für ca. 4min auf ein Plateau (ca. 5-10facher Ausgangswert), ehe sie nach 5min wieder fast den Ausgangswert erreicht. In LPA stimulierten Thrombozyten dagegen steigt die MLC-Phosphorylierung schnell innerhalb von 10s auf das ca. 23fache des Ausgangswertes an und kehrt schon nach 1minütiger LPA-Stimulation wieder auf den basalen Ausgangswert zurück (Abb. 22a). Die Abbildungen 21b und 22b zeigen repräsentative Westernblots, die den Zeitverlauf der durch mox-LDL bzw. LPA induzierten MLC-Phosphorylierung widerspiegeln. Darunter ist jeweils ein weiterer Westernblot abgebildet, der die Menge der totalen MLC darstellt, um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen geladen wurden. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, daß mox-LDL und LPA wie viele andere Thrombozyten-Aktivatoren den "shape change" über einen schnellen, temporären Anstieg in der MLC-Phosphorylierung induzieren. Dabei fällt allerdings auf, daß im Vergleich zur LPA-Stimulation nach mox-LDL-Stimulation die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten längere Zeit erhöht bleibt. Dies könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, daß mox-LDL neben LPA noch weitere (Lyso)Phospholipide enthält, die eventuell einen verzögerten Rückgang der MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten bewirken.

Abb. 21

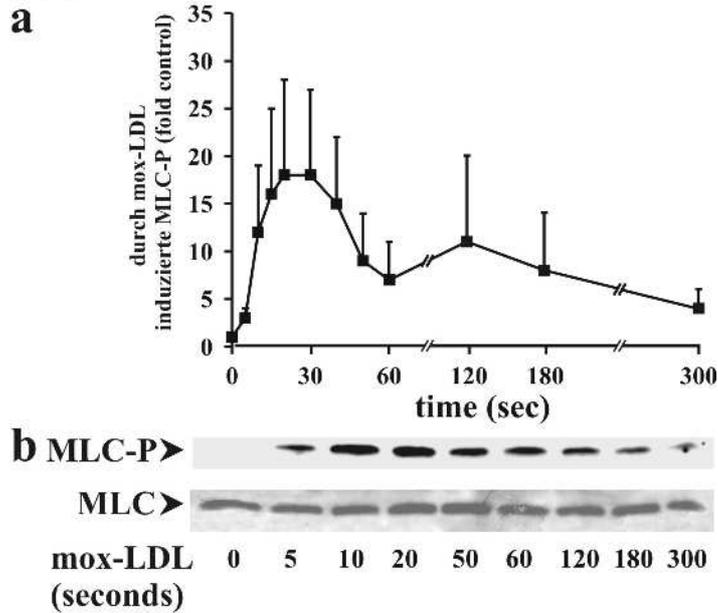


Abb. 22

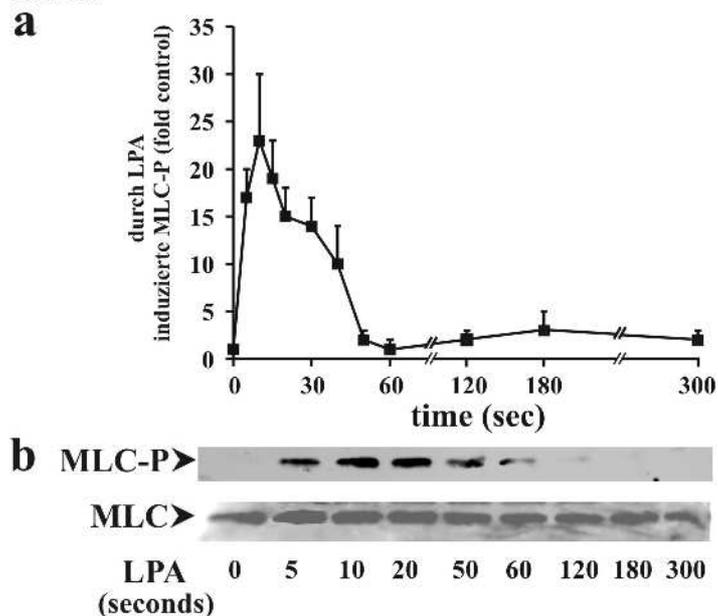


Abb. 21+22: Mox-LDL und LPA steigern die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten. Vergleich der Zeitverläufe der durch mox-LDL und LPA induzierten MLC-Phosphorylierung.

Gewaschene Plättchensuspensionen wurden mit mox-LDL (10-40µg/ml) bzw. LPA (20-40nM) stimuliert und der 'shape change' wurde im Aggregometer gemessen. Parallel dazu wurde die MLC-Phosphorylierung durch Westernblots bestimmt, wobei ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte MLC verwendet wurde. Die 20kDa-Bande, die der Anti-phospho-MLC-AK detektierte, wurde dann densitometrisch ausgewertet.

Abb. 21a+22a: Zeitverlauf der MLC-Phosphorylierung nach Stimulation mit mox-LDL (Abb. 21a) oder LPA (Abb. 22a). Die Ergebnisse sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3 Experimenten.

Abb. 21b+22b: Repräsentativer Westernblot, der den Zeitverlauf der MLC-Phosphorylierung nach Stimulation mit mox-LDL (Abb. 21b) oder LPA (Abb. 22b) widerspiegelt. Darunter ist jeweils ein weiterer Westernblot abgebildet, der die Menge der totalen MLC darstellt, um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen geladen wurden. Dabei wurde ein AK gegen die totale MLC (phosphorylierte und unphosphorylierte MLC) verwendet.

Wie schon oben erwähnt, wird die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten über zwei Signalwege reguliert: über die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige MLCK und über die Rho-Kinase. Es stellte sich daher die Frage, über welchen Signalweg mox-LDL bzw. LPA die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten steigern. Da oben schon gezeigt wurde, daß der durch mox-LDL bzw. LPA induzierte "shape change" durch Hemmung von Rho -Kinase hemmbar ist, wurde die Möglichkeit favorisiert, daß mox-LDL und LPA über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten erhöhen. Folglich wurden Thrombozyten mit dem spezifischen Rho-Inhibitor C3 Transferase (4h, 400 $\mu\text{g/ml}$) oder mit dem selektiven Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 (30min, 40 μM) inkubiert, für die angegebenen Zeitspannen mit mox-LDL bzw. LPA stimuliert und dann die MLC-Phosphorylierung durch Westernblots bestimmt. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen, daß die Hemmung von Rho bzw. Rho-Kinase die durch mox-LDL bzw. LPA induzierte MLC-Phosphorylierung vollständig hemmt. Diese Daten deuten darauf hin, daß mox-LDL und LPA die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus induzieren.

Abb. 23

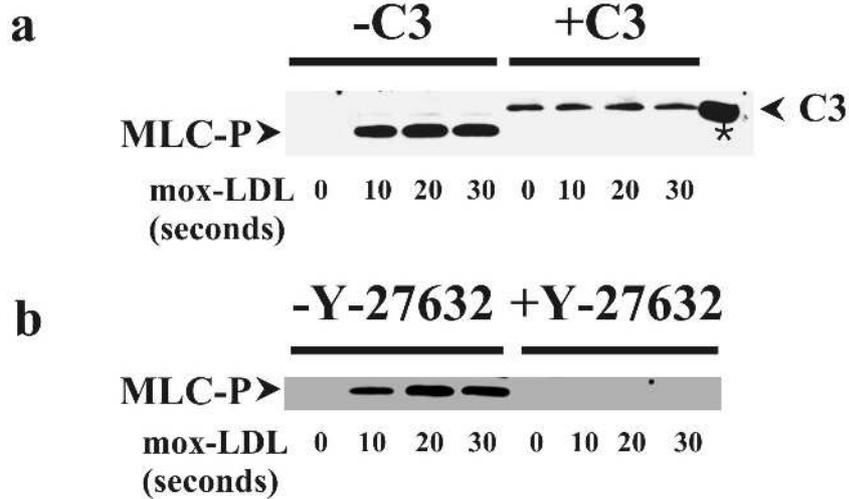


Abb. 24

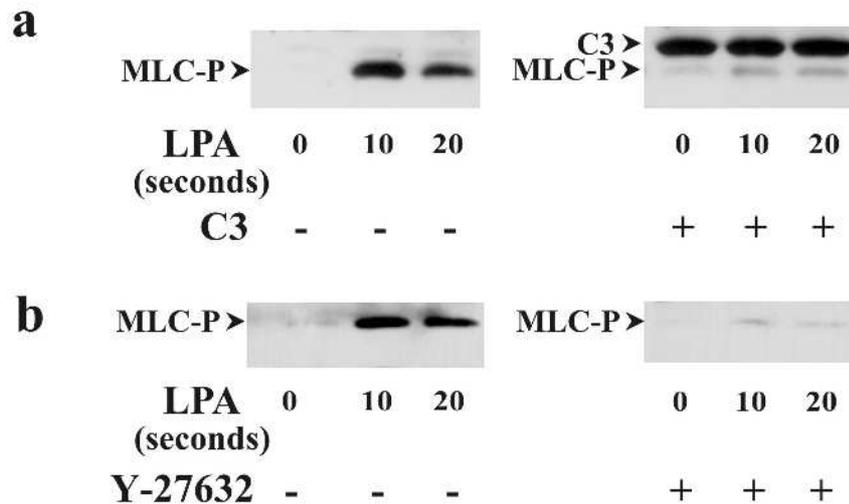


Abb. 23+24: Mox-LDL und LPA steigern die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus.

Gewaschene Thrombozytensuspensionen wurden entweder mit C3 Transferase (4h, 400µg/ml) oder mit Y-27632 (30min, 40µM) in Aggregometerküvetten vorinkubiert und dann mit mox-LDL (10-80µg/ml) oder LPA (20-80nM) stimuliert. Die MLC-Phosphorylierung wurde parallel zum "shape change" bestimmt. Dazu nahm man zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation Aliquots der Plättchensuspensionen ab und lysierte sie durch Zugabe von kochendem Sample Puffer. Für die Bestimmung der MLC-Phosphorylierung fertigte man Westernblots an, wobei man einen spezifischen AK gegen die phosphorylierte MLC verwendete. Die Westernblots sind jeweils für 3 Experimente repräsentativ. In Abb. 23a zeigt der Pfeil mit C3 auf eine Bande, die der C3 Transferase entspricht. Hier wurde nur die C3 Transferase (50µg) geladen. Der Grund dafür war, daß man die Hypothese, daß C3 Transferase mit dem Anti-phospho-MLC-AK kreuzreagiert, belegen wollte.

5.2.3. Steigerung der Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase durch mox-LDL und LPA

Im folgenden Unterkapitel wird die durch mox-LDL und LPA induzierte Moesin-Phosphorylierung im Zeitverlauf verglichen.

Wie bereits oben erwähnt spielt die MLC-Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Auslösung des "shape change": Die Phosphorylierung der MLC bewirkt eine Konformationsänderung der MLC und ermöglicht somit erst die Aktin-Myosin-Interaktion und Zellkontraktion. Damit die Aktin-Myosin-Bündel die mechanischen Kräfte, die für die Auslösung des "shape change" notwendig sind, ausüben können, müssen sie in der Plasmamembran verankert sein. Diese Verankerung erfolgt über bestimmte Proteine. Ein Protein, das die Aktin-Myosin-Filamente mit der Plasmamembran verbindet, ist beispielsweise Moesin. Kürzlich wurde gezeigt, daß während der Thrombozyten-Aktivierung durch Thrombin Moesin phosphoryliert wird (Nakamura et al., 1995). Die Phosphorylierung des Moesins am Thr-558 bewirkt eine Konformationsänderung des Moesins, das dann in der Lage ist über den N-Terminus an die Plasmamembran und über den C-Terminus an F-Aktin zu binden (Nakamura et al., 1995). Da also neben der MLC-Phosphorylierung auch die Moesin-Phosphorylierung eine bedeutende Rolle für die Auslösung des "shape change" spielt, stellte sich die Frage, ob Moesin möglicherweise auch nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL bzw. LPA phosphoryliert wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL bzw. LPA die Moesin-Phosphorylierung durch Westernblots bestimmt, wobei ein spezifischer Antikörper gegen am Thr-558 phosphoryliertes Moesin verwendet wurde. Die Abbildungen 25a und 26a zeigen, daß Moesin in unstimulierten Plättchen teilweise phosphoryliert ist. Dies wurde auch kürzlich so beschrieben (Nakamura et al., 1995). Nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL (10-40µg/ml) steigt die Moesin-Phosphorylierung innerhalb von 10-20s auf das ca. 4-5fache des Ausgangswertes an und bleibt dann für mindestens 4,5min erhöht (Abb. 25a). Nach Stimulation der Plättchen mit LPA (20-40nM) dagegen steigt die Moesin-Phosphorylierung innerhalb von 10-20s nur auf das ca. 2-2,5fache des Ausgangswertes an; sie sinkt dann aber auch innerhalb von ca. 4,5min kaum ab (Abb. 26a). Die Abbildungen 25b und 26b zeigen repräsentative Westernblots, die den Zeitverlauf der durch mox-LDL bzw. LPA induzierten Moesin-Phosphorylierung wieder spiegeln. Darunter ist jeweils ein weiterer Westernblot abgebildet, der die Menge des totalen Moesins darstellt, um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen geladen wurden. Diese Daten deuten darauf hin, daß mox-LDL und LPA ähnlich wie der Plättchenagonist Thrombin den

‘shape change‘ sowohl über einen Anstieg in der MLC - als auch über einen Anstieg in der Moesin-Phosphorylierung induzieren. Dabei fällt im Vergleich zur MLC-Phosphorylierung auf, daß Moesin in unstimulierten Thrombozyten schon teilweise phosphoryliert ist und daß der Anstieg in der Moesin-Phosphorylierung geringer ist (Moesin-Phosphorylierung: mox- LDL: 4-5facher Ausgangswert, LPA: 2-2,5facher Ausgangswert; MLC-Phosphorylierung: mox-LDL: 18facher Ausgangswert, LPA: 23facher Ausgangswert), dafür aber lange bestehen bleibt. Moesin ist in unstimulierten Thrombozyten wahrscheinlich teilweise phosphoryliert, weil es auch in diesen eine Verbindung zwischen Aktin-Myosin-Filamenten und der Plasmamembran herstellen muß. Aufgrund dieser basalen Moesin-Phosphorylierung steigt diese nach Stimulation mit mox-LDL oder LPA möglicherweise nicht mehr so stark an. Die lang andauernde Erhöhung der Moesin-Phosphorylierung ist eventuell ein Hinweis dafür, daß sie sowohl für die Auslösung des ‘shape change‘ als auch für die Aufrechterhaltung des ‘shape change‘ von Bedeutung ist.

Abb. 25

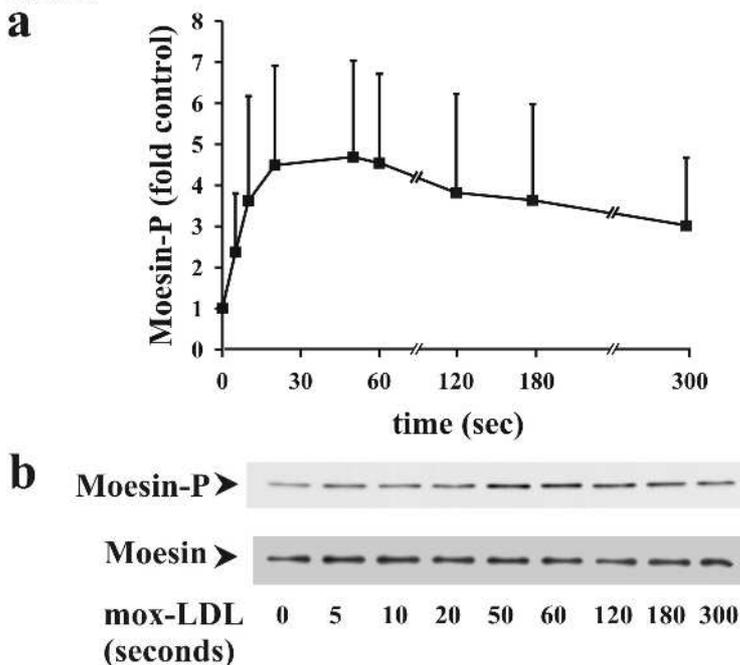


Abb. 26

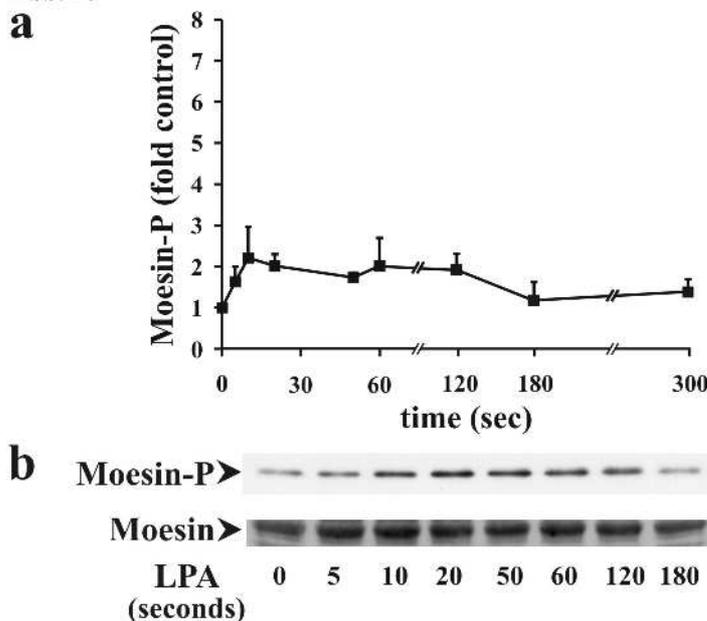


Abb. 25+26: Mox-LDL und LPA steigern die Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten. Vergleich der durch mox-LDL und LPA induzierten Moesin-Phosphorylierung im Zeitverlauf.

Gewaschene Plättchensuspensionen wurden mit mox-LDL (10-40 μ g/ml) bzw. LPA (20-40nM) stimuliert und der "shape change" wurde im Aggregometer gemessen. Parallel dazu wurde die Moesin-Phosphorylierung durch Westernblots bestimmt, wobei ein spezifischer AK gegen am Thr-558 phosphoryliertes Moesin verwendet wurde. Die 78kDa-Bande, die der Anti-phospho-Thr-558-Moesin-AK detektierte, wurde dann densitometrisch ausgewertet.

Abb. 25a+26a: Zeitverlauf der Moesin-Phosphorylierung nach Stimulation mit mox-LDL (Abb. 25a) oder LPA (Abb. 26a). Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Experimenten.

Abb. 25b+26b: Repräsentativer Westernblot, der den Zeitverlauf der Moesin-Phosphorylierung während des durch mox-LDL (Abb. 25b) bzw. LPA (Abb. 26b) induzierten "shape change" widerspiegelt. Darunter ist jeweils ein weiterer Westernblot abgebildet, der die Menge des totalen Moesins darstellt, um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen geladen wurden. Dabei wurde ein AK gegen totales Moesin (phosphoryliertes und unphosphoryliertes Moesin) verwendet.

Da kürzlich gezeigt wurde, daß Moesin ein Substrat der Rho-Kinase ist (Matsui et al., 1998; Fukata et al., 1999), wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob die durch mox-LDL oder LPA induzierte Moesin-Phosphorylierung über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus erfolgt. Dazu wurden die Thrombozyten mit C3 Transferase (4h, 400µg/ml) oder mit Y-27632 (30min, 40µM) inkubiert und für die angegebenen Zeitspannen mit mox-LDL bzw. LPA stimuliert. Die Moesin-Phosphorylierung wurde mit Hilfe von Westernblots gemessen. Die Abbildungen 27 und 28 zeigen, daß die Hemmung von Rho bzw. Rho-Kinase die durch mox-LDL bzw. LPA induzierte Moesin-Phosphorylierung deutlich reduziert. Aus diesen Daten kann man folgern, daß mox-LDL bzw. LPA die Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus induzieren.

Abb. 27

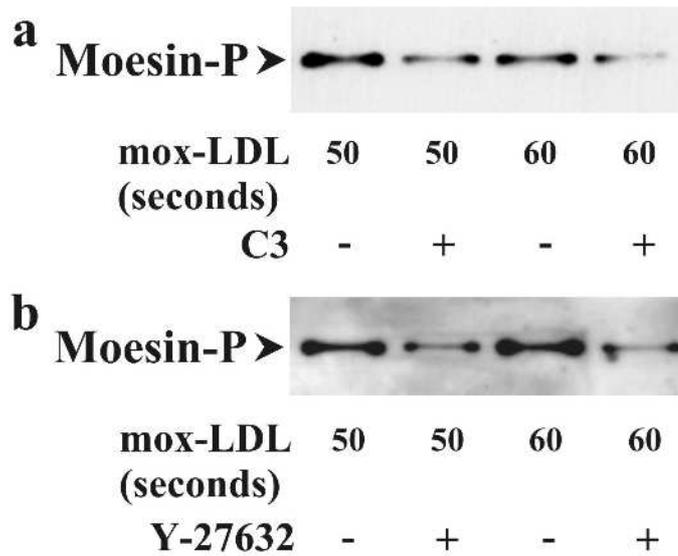


Abb. 28

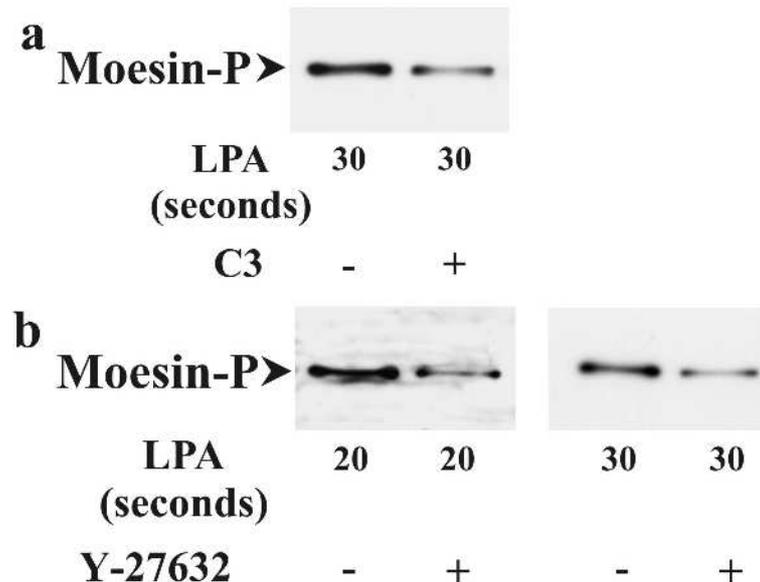


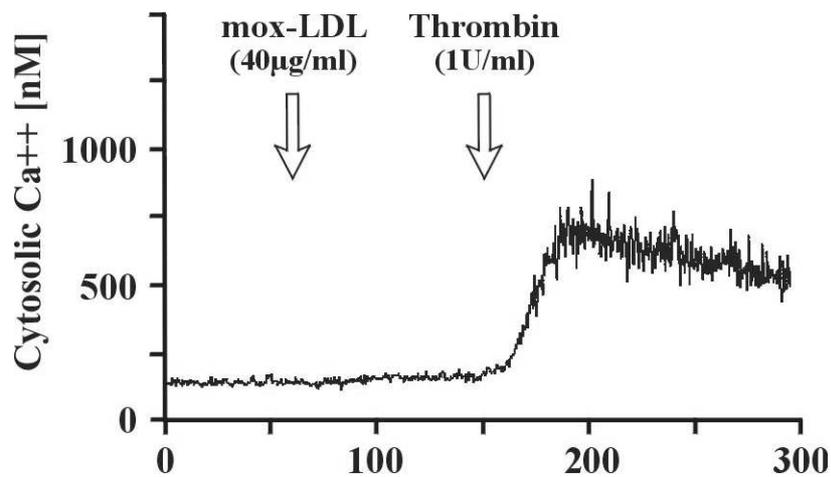
Abb. 27+28: Mox-LDL und LPA steigern die Moesin-Phosphorylierung in Thrombozyten über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus.

Gewaschene Thrombozytensuspensionen wurden entweder mit C3 Transferase (4h, 400µg/ml) oder mit Y-27632 (30min, 40µM) in Aggregometerküvetten vorinkubiert und dann mit mox-LDL (10-80µg/ml) oder LPA (20-80nM) stimuliert. Die Moesin-Phosphorylierung wurde parallel zum "shape change" bestimmt. Dazu nahm man zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation Aliquots der Plättchensuspensionen ab und lysierte sie durch Zugabe von kochendem Sample Puffer. Für die Bestimmung der Moesin-Phosphorylierung fertigte man Westernblots an, wobei man einen spezifischen AK gegen am Thr-558 phosphoryliertes Moesin verwendete. Die Westernblots sind jeweils für 3 Experimente repräsentativ.

5.2.4. Keine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Thrombozyten durch mox-LDL oder LPA

Wie schon oben erwähnt wird die MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten über die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige MLCK und über die Rho-Kinase reguliert (Klages et al., 1999). Deshalb ist es möglich, daß mox-LDL bzw. LPA eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels in Thrombozyten bewirken, und daß die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration wiederum die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige MLCK aktiviert, die daraufhin die MLC phosphoryliert und so neben der Rho-Kinase zur erhöhten MLC-Phosphorylierung beiträgt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Thrombozyten nach Stimulation mit mox-LDL bzw. LPA gemessen. Wie in Abbildung 29 dargestellt, führt mox-LDL (10-100 $\mu\text{g/ml}$) (Abb. 29a) oder LPA (20-100nM) (Abb. 29b) in den eingesetzten Konzentrationen nicht zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, wohingegen Thrombin (1Unit/ml), das man als Kontrolle einsetzte, einen deutlichen Ca^{2+} -Anstieg bewirkt. Diese Daten deuten darauf hin, daß die MLCK wahrscheinlich nicht an der durch mox-LDL bzw. LPA induzierten MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten beteiligt ist.

a



b

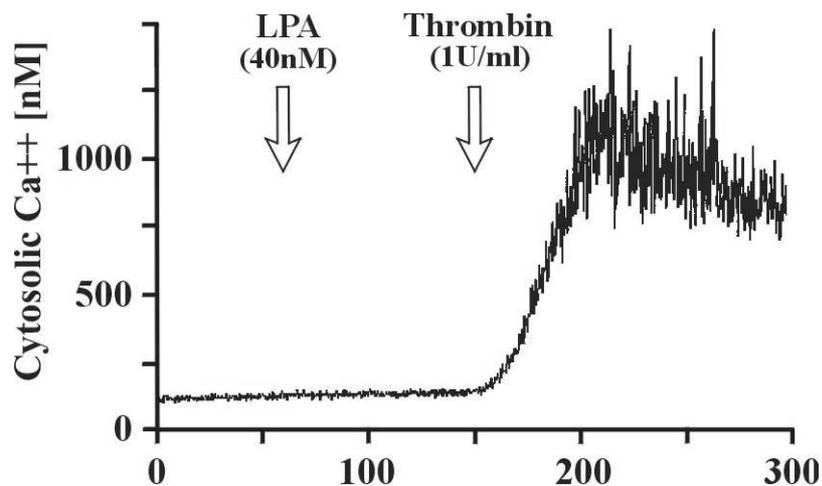


Abb. 29: Mox-LDL und LPA führen nicht zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in Thrombozyten.

Mit Fura 2-AM beladene Plättchensuspensionen wurden im Spektrofluorimeter mit mox-LDL (10-100µg/ml) bzw. mit LPA (20-100nM) stimuliert, um die Ca²⁺-abhängige Fluoreszenz zu messen. Mox-LDL (Abb. 29a) bzw. LPA (Abb. 29b) führen nicht zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration, wohingegen Thrombin (1U/ml), das man als Positivkontrolle einsetzte, einen deutlichen Ca²⁺-Anstieg bewirkt. Die Ergebnisse sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ.

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die durch ox-LDL, LPA und S1P stimulierten Signalwege in venösen Endothelzellen und Thrombozyten sowie deren mögliche pathophysiologische Bedeutung für die Arterioskleroseentstehung untersucht.

Es war bekannt, daß oxidiertes LDL in der Frühphase der Arteriosklerose zum Anstieg der Endothelpermeabilität beiträgt (Rangaswamy et al., 1997, Liao et al., 1995). Diese Endotheldysfunktion ist nach R. Ross ein entscheidendes Ereignis, das zur Entstehung der Arteriosklerose führt (Ross, 1999). Weiterhin war bekannt, daß pathologische Thrombozytenaktivierung in der Spätphase der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt: Im Rahmen der Plaqueruptur kommt es häufig zum thrombotischen Verschluss von Gefäßen, was zum Schlaganfall oder Herzinfarkt führen kann. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe hatten ergeben, daß bei der biologischen (milden) Oxidation des LDL das Lysophospholipid LPA gebildet wird, und daß LPA der Thrombozyten- und Endothelzell-aktivierende Bestandteil im milde oxidierten LDL und in atherosklerotischem Plaquematerial ist (Siess et al., 1999). LPA ist ein Aktivator der GTPase Rho und deren Effektormolekül Rho-Kinase. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Hypothese *in vitro* geprüft, ob Rho/Rho-Kinase ein für die Arterioskleroseentstehung wichtiger Signalweg sein könnte.

Es wurde der Nachweis geführt, daß Rho/Rho-Kinase-Aktivierung durch oxidiertes LDL oder Lysophospholipide zur Phosphorylierung der MLC, und damit zur Kontraktion der Endothelzellen und zum Permeabilitätsanstieg führt. Es konnte auch gezeigt werden, daß aktives Rho für die Thrombozytenaktivierung von herausragender Bedeutung ist, indem es über Erhöhung der MLC-Phosphorylierung zur Formveränderung („shape change“) der Thrombozyten führt. Der „shape change“ stellt die frühe Phase der Plättchenaktivierung dar und geht der Aggregation und Sekretion voraus. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, daß aktives Rho sowohl in der Frühphase (endotheliale Dysfunktion) als auch in der Spätphase (pathologische Thrombozytenaktivierung) der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen könnte. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen diese Annahme. Es wurde gezeigt, daß oxidiertes LDL via Rho/Rho-Kinase zur Ca^{2+} -Sensibilisierung von glatten Muskelzellen aus Skelettmuskelarterien des Hamsters führt (Bolz et al., 2000). Auch in hypertensiven Ratten scheint die erhöhte Kontraktilität der glatten Muskulatur auf eine durch Rho-Kinase vermittelte Ca^{2+} -Sensibilisierung der glatten Muskelzellen zurückzuführen zu sein (Uehata et al., 1997, Somlyo, 1997).

Aufgrund der oben berichteten Ergebnisse ist die Annahme berechtigt, daß Rho und Rho-Kinase in Zukunft zu möglichen Zielen therapeutischer Intervention werden könnten. Zusätzlich hatten präklinische Studien mit Rho/Rho-Kinase Inhibitoren ermutigende Resultate. Durch Verwendung des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 läßt sich beispielsweise die Ca^{2+} -Sensibilisierung und folglich auch die Kontraktion von glatten Muskelzellen in hypertensiven Ratten inhibieren. Auf diese Weise kann der Hypertonus gesenkt werden (Uehata et al., 1997, Mukai et al., 2001). Weiterhin ist bekannt, daß die Aktivität der Rho GTPasen durch Statine (=HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren) moduliert wird. Statine hemmen die Isoprenylierung der Rho GTPasen. Die Isoprenylierung wiederum ist für die GTP-Bindungsaktivität und für die Membrantranslokation also für die Aktivierung der Rho GTPasen entscheidend (Laufs und Liao, 2000). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (=Statine) die Proliferation glatter Muskelzellen durch Hemmung von Rho inhibieren (Laufs et al., 1999) und somit der Arterioskleroseentwicklung entgegenwirken. Weiterhin induzierte die Beendigung der Statintherapie in normocholesterinämischen Mäusen über Rho-Aktivierung eine Suppression der endothelialen NO-Produktion (Laufs et al., 2000). Der Grund dafür ist wahrscheinlich ein durch das Aktinzytoskelett vermittelter negativer Rückkopplungsmechanismus auf die Rho-Genexpression (Laufs et al., 2000). Zusätzlich scheinen Statine beim Schlaganfall neuroprotektive Effekte zu haben (Laufs et al., 2000). Simvastatin erhöht nach experimenteller Okklusion der A. cerebri media in Mäusen durch Hemmung von Rho und "upregulation" der NO -Synthase den Blutfluß in die ischämischen Regionen und reduziert so die Größe des ischämischen Infarktareals (Laufs et al., 2000). Unsere eigene Gruppe konnte außerdem zeigen, daß die durch mox-LDL via Rho induzierte Endothelzell- und Thrombozytenaktivierung wie sie auch im Rahmen der Arteriosklerose vorkommt durch Lovastatin gehemmt wird (Essler et al., Ann N Y Acad Sci, 2000).

Im Folgenden soll der Mechanismus über den Rho/Rho-Kinase zum Anstieg der Endothelpermeabilität und Thrombozytenaktivierung führt, im Detail besprochen werden.

Mox-LDL und LPA führen nach 1-2minütiger Stimulation der Endothelzellen über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase zur Endothelzellkontraktion und Aktinstreißfaserbildung. Zu diesen Aktinzytoskelettveränderungen über Aktivierung von Rho kommt es auch, wie kürzlich gezeigt wurde, nach Stimulation der Endothelzellen mit der vasoaktiven Substanz Thrombin (Essler et al., J Biol Chem, 273, 1998) oder dem bakteriellen Toxin von *Pasteurella Multocida*.

da (Essler et al., J Immunol, 1998). Ähnlich verhalten sich manche Fibroblasten (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996), neuronale Zellen (Jalink et al., 1994), menschliche und Maus-Makrophagen (Aepfelbacher et al., 1996, Allen et al., 1997) und HeLa-Zellen (Leung et al., 1996). Auch hier bewirkt aktiviertes Rho eine Kontraktion der Zellen. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten von NIH 3T3 Fibroblasten und Vero-Zellen, in denen aktiviertes Rho zur Ausbreitung und inaktiviertes Rho zur Abrundung der Zellen führt (Schmidt et al., 1997, Flatau et al., 1997). Möglicherweise ist aber die Abrundung von Zellen nach längerer Inaktivierung von Rho nicht als eine aktive Kontraktion, sondern eher als eine Retraktion im Rahmen des Zellunterganges, anzusehen.

Es konnte gezeigt werden, daß die durch mox-LDL induzierte Endothelzellkontraktion und Aktinstreißfaserbildung sich in einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität ausdrücken und erstmals konnte gezeigt werden, daß diese durch mox-LDL induzierte Erhöhung der endothelialen Permeabilität über einen Rho/Rho-Kinase abhängigen Mechanismus erfolgt. Ein durch mox-LDL induzierter, an der Erhöhung der Permeabilität beteiligter intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg ließ sich bei den von uns verwendeten mox-LDL-Konzentrationen ausschließen. Präliminäre Daten weisen außerdem daraufhin, daß auch LPA und S1P in den verwendeten Konzentrationen nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Endothelzellen führen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit kürzlich publizierten Daten, die zeigen, daß LPA ohne intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg zur erhöhten Permeabilität in Endothelzellen führt (Amerongen et al., 2000). In Thrombozyten waren die Ergebnisse ähnlich: in den verwendeten Konzentrationen führten weder mox-LDL noch LPA zu einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg. In anderen Zellen wie zum Beispiel glatten Muskelzellen (Parizi et al., 2000), Fibroblasten (Mattie et al., 1994, Pietruck et al., 1997) und Astrozyten (Tas und Koschel, 1998) dagegen, sind die Effekte von mox-LDL, LPA und S1P unter anderem durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bedingt. Die durch mox-LDL oder LPA induzierte Endothelzellkontraktion und Aktinstreißfaserbildung sind also unabhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Andere Gruppen haben gezeigt, daß die Rho-Kinase über Phosphorylierung und damit Inaktivierung der MLC-Phosphatase zur vermehrten MLC-Phosphorylierung führt, die durch Aktin-Myosin-Interaktion Veränderungen des Aktinzytoskeletts bedingt (Kimura et al., 1996, Leung et al., 1996, Nakai et al., 1997, Suzuki et al., 1999). Mox-LDL und LPA bewirken nach 30sekündiger Stimulation der Endothelzellen eine Absenkung der MLC-Phosphatase-Aktivität, was wiederum eine vermehrte MLC-Phosphorylierung bedingt. Außerdem ist bekannt, daß die Rho-Kinase *in vitro* die MLC direkt

phosphorylieren kann (Amano et al., 1996). Es ist allerdings unklar, welchen Anteil jeder der beiden Mechanismen am Anstieg der MLC-Phosphorylierung hat.

Mox-LDL und LPA modulieren die Endothelzellmorphologie und -funktion dadurch, daß sie an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Edg-Familie binden. Die Rezeptoren für mox-LDL müssen den LPA-Rezeptoren ähnlich oder sogar mit diesen identisch sein, da sich wie von unserer Gruppe kürzlich gezeigt wurde, die durch mox-LDL induzierten Endothelzelleffekte durch spezifische LPA-Rezeptor-Antagonisten hemmen lassen (Siess et al., 1999, Essler et al., Ann N Y Acad Sci, 2000). Weiterhin wurde von unserer Gruppe gezeigt, daß bei der milden Oxidation von LDL LPA gebildet wird und, daß LPA die biologisch aktive Komponente in mox-LDL darstellt (Siess et al., 1999). LPA aktiviert die Rezeptoren Edg-2, -4 und -7 der Edg-Familie (Goetzl und An, 1998). In HUVEC sind wie präliminäre Daten unserer Gruppe zeigen, allerdings nur die Rezeptoren Edg-1, Edg-4 und Edg-5 exprimiert. Deshalb erfolgen die durch mox-LDL und LPA induzierten Endothelzellveränderungen möglicherweise über Aktivierung von Edg-4. Nach Stimulation des G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptors wird wahrscheinlich über das heterotrimere G-Protein G13 und dazwischengeschaltete Tyrosin-Kinasen Rho aktiviert (Gohla et al., 1998). Rho aktiviert dann sein Effektormolekül, die Rho-Kinase, die die "Myosin Binding Subunit" (MBS, 130kDa) der MLC -Phosphatase phosphoryliert und dadurch die MLC-Phosphatase inaktiviert (Nakai et al., 1997). *In vitro* kann die Rho-Kinase die MLC auch direkt am Ser-19 phosphorylieren (Amano et al., 1996).

Der Sphingolipid-Metabolit S1P ist strukturell nahe mit LPA verwandt. Deshalb wurden in dieser Arbeit seine Effekte auf die Morphologie von Endothelzellen mit denen von LPA und mox-LDL verglichen. S1P wird durch enzymatische Spaltung von Sphingomyelin aus den Membranen aktivierter Zellen bei Gewebsverletzung, Entzündung und Neoplasie gebildet (Goetzl und An, 1998). S1P bindet an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Edg-1, Edg-3, Edg-5, Edg-6 und Edg-8 der Edg-Familie (An et al., 1997, Lee et al., 1998, Zondag et al., 1998). Nach der Rezeptorbindung beeinflusst S1P die Zellmorphologie und Kontraktilität durch Aktivierung von Rho (Postma et al., 1996). Da S1P im menschlichen Blutplasma vorhanden ist (Tokumura, 1995), ist es wahrscheinlich, daß es Endothelzellen stimuliert und an der Regulation der Endothel-Morphologie *in vivo* beteiligt ist. Tatsächlich wurde vor kurzem berichtet, daß S1P die chemotaktische Motilität und Proliferation von Endothelzellen als auch die Angiogenese stimuliert (Wang et al., 1999). Die Aufklärung von Signalwegen, durch die S1P die Endothelzellmorphologie stimuliert, führt zu einem besseren Verständnis der Endothelzellmigration, für die regulierte Sequenzen von Zellkontraktion und Ausbreitung Voraus-

setzung sind. Diese Reorganisation des Aktinzytoskeletts in migrierenden Endothelzellen unterliegt, wie schon seit längerer Zeit bekannt, der Kontrolle der Rho GTPasen (Aepfelbacher et al., 1997). Aktivierung und Inaktivierung von verschiedenen Rho GTPasen in bestimmter Reihenfolge ist also für die Endothelzellmigration, die im Rahmen der Angiogenese, Embryonalentwicklung, Wundreparatur und Tumormetastasierung eine wichtige Rolle spielt, von entscheidender Bedeutung.

Nach Bindung an den G-Protein-gekoppelten Edg-Rezeptor kommt es nach 0,5-1minütiger Stimulation der Endothelzellen mit S1P über Aktivierung von Rho zur Endothelzellkontraktion und Aktinstreißfaserbildung. Daraufhin folgt nach 1-2minütiger S1P-Stimulation die Endothelzellausbreitung und Bildung von ‘membrane ruffles‘ über Aktivierung von Rac. Daß die Ausbildung der ‘membrane ruffles‘ über einen Rac-abhängigen Mechanismus erfolgt, ist bereits seit längerer Zeit bekannt (Ridley et al., 1992, Hall, 1998). Die Aktivierung von Rac konnte durch verschiedene Experimente belegt werden:

1. Die Mikroinjektion von dominant negativem N17Rac hemmt die durch S1P induzierte Bildung der ‘membrane ruffles‘.
2. Durch S1P aktiviertes Rac transloziert nach 1-2minütiger S1P-Stimulation aus dem Zytoplasma an die peripheren Membranen.
3. Im Rac ‘pull-down assay‘ findet sich nach 1-2minütiger S1P-Stimulation eine Erhöhung der Rac-Aktivität.

In CHO-Zellen führt S1P über Edg-1 und Edg-3 zur Aktivierung von Rac und Ausbildung von ‘membrane ruffles‘ (Okamoto et al., 2000). In NIH 3T3-Fibroblasten bewirkt aktiviertes Rac über Inaktivierung von Rho sowohl eine Ausbreitung der Zellen als auch die Bildung von ‘membrane ruffles‘ (Sanders et al., 1999). Auch in Endothelzellen führt aktiviertes Rac zur Inaktivierung von Rho. So hemmt mikroinjiziertes konstitutiv aktives V12Rac die Rho/Rho-Kinase abhängige MLC-Phosphorylierung. Auch während der Neuritenbildung hemmen sich Rac- und Rho-vermittelte Signalwege gegenseitig (Leeuwen et al., 1997).

Aktiviertes Rac aktiviert sein Effektormolekül die ‘p21 activated kinase‘ (PAK), die wiederum zur Phosphorylierung und dadurch Inaktivierung der MLCK und zur Phosphorylierung der ‘myosin heavy chain‘ führt (Sanders et al., 1999, Burridge, 1999). Die Phosphorylierung der ‘myosin heavy chain‘ verhindert eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin. So verhindert Rac die Zellkontraktion durch mindestens 3 Mechanismen: 1. Inaktivierung von Rho, 2.

‘myosin heavy chain“-Phosphorylierung und 3. Inaktivierung der MLCK. Andererseits ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß Rac Rho auch aktivieren kann (Tapon und Hall, 1997).

Nach 5-15minütiger Stimulation der Endothelzellen mit S1P verschwinden die ‘membrane ruffles“und über Aktivierung von Rho/Rho -Kinase kommt es erneut zur Endothelzellkontraktion und Aktinstreißfaserbildung. Die durch S1P induzierte Morphologie spiegelt die durch S1P regulierte MLC-Phosphatase-Aktivität und MLC-Phosphorylierung wieder.

Im Unterschied zur Stimulation mit mox-LDL oder LPA wird die MLC-Phosphatase nach S1P-Stimulation nach 30s inaktiviert, steigt nach 1-2minütiger S1P-Stimulation wieder auf den basalen Ausgangswert an und wird nach 5-15minütiger S1P-Stimulation zum zweiten Mal ‘downreguliert“. Nach Stimulation mit mox -LDL oder LPA findet sich nur eine einmalige Inaktivierung der MLC-Phosphatase nach 0,5-2min. Die zweimalige Inaktivierung der MLC-Phosphatase nach S1P-Stimulation korreliert jeweils mit einer Rho/Rho-Kinase-abhängigen vermehrten MLC-Phosphorylierung und Endothelzellkontraktion. Die nach 1-2minütiger S1P-Stimulation auftretende MLC-Phosphatase-Aktivierung korreliert mit einer Rac-abhängigen Bildung von ‘membrane ruffles“und Endothelzellausbreitung. Die transiente Rac-Aktivierung scheint ein spezifischer S1P-Effekt zu sein und könnte durch einen spezifischen Edg-Rezeptor vermittelt werden. Präliminäre Daten unserer Gruppe zeigen, daß in HUVEC die S1P-Rezeptoren Edg-1 und Edg-5 exprimiert sind. Während Rho über das heterotrimere G-Protein G13 wohl eher an Edg-4 gekoppelt ist, ist Rac über ein bisher unbekanntes heterotrimeres G-Protein wohl eher an Edg-1 gekoppelt (unpublizierte Daten). Die Daten zeigen also, daß das Gleichgewicht zwischen Rho- und Rac-Aktivität den zellulären Phänotyp während der Aktivierung der Endothelzellen mit S1P bestimmt. Die gegenseitige Hemmung und Aktivierung von Rac und Rho könnte bei der schnellen Regulation der durch S1P induzierten Zellausbreitung und Zellkontraktion während der Endothelzellmigration eine Rolle spielen.

Der ‘shape change“ der Thrombozyten ist die erste Antwort der Plättchen auf Aktivierung durch mox-LDL, LPA oder andere Agonisten (Siess, 1989). Er geht der Aggregation und Sekretion voraus. Der ‘shape change“ ist ein kontraktiler Vorgang und besteht in Abrundung und Kontraktion der Thrombozyten und in der Ausbildung von Pseudopodien. Er wird durch MLC-Phosphorylierung (Adelstein et al., 1978, Daniel et al., 1984, Bauer et al., 1999) ausgelöst. Die MLC-Phosphorylierung und der ‘shape change“ werden in menschlichen und Mäu-

se-Thrombozyten durch 2 Signalwege reguliert (Klages et al., 1999, Bauer et al, 1999): durch die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige MLCK einerseits und durch die Rho-Kinase andererseits. Plättchen-Agonisten wie Ionomycin und ADP führen zur Ca^{2+} -Freisetzung und Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen MLCK in Thrombozyten (Wilde et al., 2000). Andere Agonisten wie der Thrombin-Rezeptor-Agonist YFLLRNP oder das Thromboxan-Analogon U 46619 führen zur Aktivierung von Rho/Rho-Kinase.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in mehreren Arbeiten erstmals zeigen, daß mox-LDL und LPA über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase die MLC-Phosphorylierung und den "shape change" in Thrombozyten bewirken (Essler et al., Ann N Y Acad Sci, 2000). Da mox-LDL und LPA nicht zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Thrombozyten führten, ließ sich eine Beteiligung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen MLCK ausschließen. Im Gegensatz zu mox-LDL und LPA führte S1P in entsprechender Konzentration nicht zu einer Aktivierung der Thrombozyten.

Es ist bekannt, daß bei der Plättchenaktivierung durch Thrombin das Protein Moesin am Thr-558 phosphoryliert wird (Nakamura et al., 1995). Außerdem weiß man, daß Moesin ein Effektormolekül der Rho-Kinase ist und durch diese phosphoryliert wird (Shaw et al., 1998, Matsui et al., 1998). Moesin ist ein Verbindungsprotein zwischen der Plasmamembran und Aktinfilamenten. Durch Phosphorylierung am Thr-558 ändert Moesin seine Konformation und ist dann in der Lage an die Plasmamembran über den N-Terminus und an F-Aktin über den C-Terminus zu binden.

Nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL oder LPA erfolgt über Aktivierung von Rho/Rho-Kinase die MLC-Phosphorylierung, die eine Interaktion zwischen Aktin und Myosin erlaubt. Dadurch bilden sich kontraktile Aktin-Myosin-Filamente. Die Rho-Kinase phosphoryliert außerdem das Protein Moesin, das dann die Interaktion zwischen den neugebildeten Filamenten und der Plasmamembran vermittelt. Sowohl die MLC-Phosphorylierung als auch die Moesin-Phosphorylierung sind daher für den "shape change" von großer Bedeutung. Nach Stimulation der Thrombozyten mit mox-LDL oder LPA steigt die MLC-Phosphorylierung innerhalb kürzester Zeit (10-20s) auf das ca. 20fache des Ausgangswertes an und sinkt danach innerhalb von ca. 1 Minute schnell wieder ab. Im Vergleich dazu steigt die Moesin-Phosphorylierung nach Stimulation mit mox-LDL oder LPA nur auf das ca. 2-5fache des Ausgangswertes an, bleibt aber lange (mindestens 5 Minuten) erhöht. Dies könnte

darauf hindeuten, daß die MLC-Phosphorylierung mehr für die Induktion des "shape change", die Moesin-Phosphorylierung mehr für die Aufrechterhaltung von Bedeutung ist.

Mox-LDL und LPA aktivieren die Thrombozyten durch Bindung an spezifische G-Proteingekoppelte LPA-Rezeptoren (Siess et al., 1999). So wurde kürzlich gezeigt, daß der durch mox-LDL induzierte "shape change" durch spezifische LPA -Rezeptor-Antagonisten hemmbar ist (Siess et al., 1999, Essler et al., Ann N Y Acad Sci, 2000). Nach Bindung von mox-LDL oder LPA an den Rezeptor wird wahrscheinlich über G13 Rho/Rho-Kinase aktiviert, die daraufhin die MLC-Phosphatase phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Dies führt zur vermehrten MLC-Phosphorylierung und damit zum "shape change".

Abschließend ist es noch wichtig die durch mox-LDL, LPA bzw. S1P induzierte Endothelzell- und Thrombozytenaktivierung zu vergleichen. Zuerst fällt auf, daß S1P in der von uns eingesetzten Konzentration (1µM) Plättchen nicht aktiviert. Dies steht im Widerspruch zu älteren Daten einer anderen Gruppe, die zeigen, daß S1P eine Formveränderung (shape change) und auch Aggregation der Thrombozyten induziert (Yatomi et al., 1995, Yatomi et al., 1997). Andererseits zeigen neuere Daten, daß S1P die Plättchenaggregation eher inhibiert (Nugent und Xu, 2000). Kürzlich wurde außerdem gezeigt, daß in Thrombozyten die Edg-Rezeptoren 2, 4, 6 und 7 exprimiert sind (Motohashi et al., 2000). Edg-2, -4 und -7 sind LPA-Rezeptoren, Edg-1, -3, -5, -6 und -8 stellen S1P-Rezeptoren dar (Pyne und Pyne, 2000). Das bedeutet, daß in Thrombozyten viele LPA-Rezeptoren, aber nur ein S1P-Rezeptor exprimiert zu sein scheint. Deshalb erscheint es auch verständlich, daß in unseren Experimenten LPA die Thrombozyten stark aktiviert, wohingegen S1P die Plättchen kaum oder gar nicht aktiviert. Weiterhin fällt beim Vergleich der durch mox-LDL und LPA induzierten Endothelzell- und Thrombozytenaktivierung auf, daß für die Thrombozytenaktivierung im Vergleich zur Endothelzellaktivierung viel geringere Konzentrationen an mox-LDL (ein Fünftel der Konzentration für die Endothelzellaktivierung) und LPA (ein Zwanzigstel der Konzentration für die Endothelzellaktivierung) eingesetzt werden. Dies hat möglicherweise damit zu tun, daß in Thrombozyten andere LPA-Rezeptoren exprimiert sind als in Endothelzellen (LPA-Rezeptoren in Thrombozyten: Edg-2, -4 und -7, LPA-Rezeptoren in Endothelzellen: Edg-4). Zusätzlich scheinen Blutplättchen überhaupt hochempfindlich zu sein. So reagieren sie beispielsweise mit Formveränderung auf mechanische Einflüsse, Kälte oder andere Agonisten. Der Sinn dieser schnellen Formveränderung bzw. hohen Empfindlichkeit liegt in der schnellen Bildung eines Thrombus und damit schnellen Blutstillung einer Verletzung in vivo. Weiterhin muß man darauf hinweisen, daß der durch mox-LDL bzw. LPA induzierte Anstieg und

Rückgang der MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten viel schneller erfolgt als in Endothelzellen. So steigt in Thrombozyten nach Stimulation mit mox-LDL bzw. LPA die MLC-Phosphorylierung innerhalb von 10-20s auf ein Maximum und fällt schon nach einer Minute fast wieder auf den Ausgangswert ab. In Endothelzellen dagegen steigt nach mox-LDL bzw. LPA-Stimulation die MLC-Phosphorylierung erst nach ca. 1-2min auf ein Maximum. Dieses bleibt über einige Minuten bestehen, so daß die MLC-Phosphorylierung erst nach 5-15min wieder absinkt. Ein möglicher Grund für den schnelleren Anstieg der MLC-Phosphorylierung in Plättchen besteht darin, daß in Thrombozyten mehr LPA-Rezeptoren als in Endothelzellen exprimiert sind. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, daß auf den suspendierten Plättchen mehr LPA-Rezeptoren für die mox-LDL- bzw. LPA-Bindung frei zur Verfügung stehen. Außerdem ist auch denkbar, daß in Thrombozyten mehr Rho bzw. aktives Rho vorhanden ist. Der schnelle Anstieg der MLC-Phosphorylierung in Thrombozyten ist für die Induktion des "shape change" entscheidend. Der Rückgang der MLC -Phosphorylierung dagegen beendet den "shape change" und kennzeichnet den erneuten Übergang in die Plättchenform. Die rasch mögliche Veränderung der MLC-Phosphorylierung ist also für reversible Vorgänge wie den "shape change" bedeutsam. Die physiologische Bedeutung der schnellen Plättchenaktivierung liegt in der schnellen Bildung eines Thrombus bei der Blutstillung in vivo. Die im Vergleich zur Thrombozytenaktivierung durch mox-LDL bzw. LPA induzierte langsamere Endothelzellaktivierung liegt möglicherweise in der geringeren Anzahl an exprimierten oder frei zur Verfügung stehenden LPA-Rezeptoren begründet. Physiologisch stellt die langsamere Reaktivität des Endothels einen Schutz gegen pathologische Substanzen dar und hilft die Integrität des Endothels zu erhalten.

7. Zusammenfassung

Oxidiertes "Low density Lipoprotein" (LDL) trägt durch Aktivierung von vaskulären Endothelzellen und Thrombozyten zum Fortschreiten der Atherosklerose bei. Da die durch milde oxidiertes LDL (mox-LDL) aktivierten Signalwege in Endothelzellen und Thrombozyten bisher nur unzureichend charakterisiert waren, wurden sie in dieser Arbeit näher untersucht. Weiterhin wurde ausgehend von der Beobachtung, daß es bei milder Oxidation von LDL zur Bildung von Lysophosphatidsäure (LPA) kommt, und daß LPA die spezifische Thrombozyten-aktivierende Substanz im milde oxidierten LDL ist, in dieser Arbeit in *in vitro* Modellen untersucht, ob LPA und das strukturell und funktionell verwandte Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Signalwege regulieren, die zur pathologischen Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen beitragen. Als Modellsysteme wurden unter anderem die endotheliale Permeabilität und der Plättchen-"shape change" herangezogen. Es konnte gezeigt werden, daß milde oxidiertes LDL und LPA sowohl in Endothelzellen als auch in Thrombozyten - über Membran-gebundene LPA-Rezeptoren - die GTPase Rho und deren Effektormolekül Rho-Kinase aktivieren. Rho-Kinase hemmt die Myosin Leichtketten Phosphatase, wodurch es zum Anstieg der Myosin Leichtketten Phosphorylierung kommt. Myosin Leichtketten Phosphorylierung führt (i) zur Kontraktion von Endothelzellen, die wiederum einen Anstieg der endothelialen Permeabilität auslöst, und (ii) zur Formveränderung (shape change) von Thrombozyten, dem ersten Anzeichen der Plättchen-Aktivierung. Das Lysophospholipid S1P dagegen induziert in Endothelzellen sequentiell (1) Rho/Rho-Kinase abhängige Myosin Leichtketten Phosphatase-Inaktivierung, Myosin Leichtketten Phosphorylierung und Endothelzellkontraktion, (2) Rac abhängige Myosin Leichtketten Phosphatase-Aktivierung, Ausbildung von "membrane ruffles" und Endothelzellausbreitung und (3) erneute Rho/Rho-Kinase abhängige Myosin Leichtketten Phosphatase-Inaktivierung und Endothelzellkontraktion. Das durch S1P regulierte Wechselspiel zwischen Rho- und Rac-Aktivität und die dadurch regulierten Sequenzen von Zellkontraktion und -ausbreitung sind wahrscheinlich für die Endothelzellmigration im Rahmen von Angiogenese und Wundreparatur von Bedeutung. Den Lysophospholipiden könnte also eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose und in der Regulation von Angiogenese und Wundreparatur zukommen. Die pharmakologische Hemmung des Rho/Rho-Kinase Signalweges könnte möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt zur Behandlung der Atherosklerose darstellen.

8. Literatur

Adelstein RS, Conti MA and Barylko B: The role of myosin phosphorylation in regulating actin-myosin interaction in human blood platelets.

Thromb Haemost, 40: 241-4, 1978

Aepfelbacher M, Essler M, Huber E, Czech A and Weber PC: Rho is a negative regulator of human monocyte spreading.

J Immunol, 157: 5070-5, 1996

Aepfelbacher M, Essler M, Huber E, Sugai M and Weber PC: Bacterial toxins block endothelial wound repair. Evidence that Rho GTPases control cytoskeletal rearrangements in migrating endothelial cells.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(9): 1623-9, 1997

Aktorics K, Braun S, Rösener S, Just I and Hall A: The rho gene product expressed in E. coli is a substrate for botulinum ADP-ribosyltransferase C3.

Biophys Res Commun, 158: 209-13, 1989

Albelda SM, Smith CW and Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury.

FASEB J, 8(8): 504-12, 1994

Alessi D, MacDougall LK, Sola MM, Ikebe M and Cohen P: The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1.

Eur J Biochem, 210(3): 1023-35, 1992

Allen WE, Jones GE, Pollard JW and Ridley AJ: Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages.

J Cell Sci, 110: 707-20, 1997

Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y and Kaibuchi K: Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase).

J Biol Chem, 271: 20246-49, 1996

Amerongen GP, Vermeer MA and van Hinsbergh VW: Role of RhoA and rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20(12): 127-33, 2000

An S, Bleu T, Huang W, Hallmark OG, Coughlin SR, Goetzl EJ: Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysosphingolipids.

FEBS Lett, 417(3): 279-82, 1997

Ardlie NG, Selley ML and Simons LA: Platelet activation by oxidatively modified low density lipoproteins.

Atherosclerosis, 76: 117-24, 1989

Balazs L, Ferrebee M, Okolicany J and Tigyi G: Accelerated wound healing after lysophosphatidate treatment of the skin.

Univ of Ten Res Corp Pat Disclosure, PD. 96001, 1996

Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, Tolley B and Tigyi G: Topical application of the phospholipid growth factor lysophosphatidic acid promotes wound healing in vivo.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 280(2): R466-72, 2001

Bauer M, Retzer M, Wilde J, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson SP and Siess W: Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact platelets.

Blood, 94: 1655-72, 1999

Becker BF, Heindl B, Kupatt C and Zahler S: Endothelial function and hemostasis.

Z Kardiol, 89(3): 160-7, 2000

Boguski M and McCormick F: Proteins regulating Ras and its relatives.

Nature, 366: 643-54, 1993

Bokoch GM and Knaus UG: The role of small GTP-binding proteins in leukocyte function.

Curr Opin Immunol, 6(1): 98-105, 1994

Bokoch GM: Regulation of cell function by Rho family GTPases.

Immunol Res, 21(2-3): 139-48, 2000

Bolz SS, Galle J, Derwand R, de Wit C and Pohl U: Oxidized LDL increases the sensitivity of the contractile apparatus in isolated resistance arteries for Ca^{2+} via a rho- and rho kinase-dependent mechanism.

Circulation, 102(19): 2402-10, 2000

Bornfeldt KE, Graves LM, Raines EW, Igarashi Y, Wayman G, Yamamura S, Yatomi Y, Sidhu JS, Krebs EG, Hakomori S et al.: Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction.

J Cell Biol, 130: 193-206, 1995

Burridge K: Crosstalk between Rac and Rho.

Science, 283(5410): 2028-9, 1999

Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM: Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoprotein making it cytotoxic.

J Leukoc Biol, 38: 341-350, 1985

Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ and Gill DM: The mammalian G protein Rho C is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in vero cells.

EMBO, 8: 1087-92, 1989

Chatah NE and Abrams CS: G-protein coupled receptor activation induces the membrane translocation and activation of PIP5K Ia by a RAC and RHO-dependent pathway.

J Biol Chem, Jun 28, 2001

Chrzanowska-Wodnicka M and Burridge K: Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions.

J Cell Biol, 133: 1403-15, 1996

Chung CY, Lee S, Briscoe C, Ellsworth C and Firtel RA: Role of Rac in controlling the actin cytoskeleton and chemotaxis in motile cells.

Proc Natl Acad Sci USA, 97(10): 5225-30, 2000

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM: Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.

Blood, 91(10): 3527-61, 1998

Curtiss LK, Black AS, Takagi Y, Plow EF: New mechanism for foam cell generation in atherosclerotic lesions.

J Clin Invest, 80: 367-73, 1987

Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S and Spiegel S: Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate.

Nature, 381: 800-3, 1996

Cuvillier O, Rosenthal DS, Smulson ME and Spiegel S: Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes.

J Biol Chem, 273: 2910-6, 1998

Daniel JL, Molish IR, Rigmaiden M and Stewart G: Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response.

J Biol Chem, 259(15): 9826-31, 1984

Daniels RH, Bokoch GM: p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling?

Trends Biochem Sci, 24(9): 350-5, 1999

Del Pozo MA, Price LS, Alderson NB, Ren XD and Schwartz MA: Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK.

EMBO J, 19(9): 2008-14, 2000

Dent P, MacDougall LK, MacKintosh C, Campbell DG and Cohen P: A myofibrillar protein phosphatase from rabbit skeletal muscle contains the beta isoform of protein phosphatase-1 complexed to a regulatory subunit which greatly enhances the dephosphorylation of myosin. *Eur J Biochem*, 210(3): 1037-44, 1992

Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I and Moolenaar WH: The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*, 291: 677-80, 1993

Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T and Snyderman R: Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, 264(28): 16378-82, 1989

Erickson JR, Wu JJ, Goddard JG, Tigyi G, Kawanishi K, Tomei LD and Kiefer MC: Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 273(3): 1506-10, 1998

Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC, Aepfelbacher M: Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 273(34): 21867-74, 1998

Essler M, Hermann K, Amano M, Kaibuchi K, Heesemann J, Weber PC and Aepfelbacher M: *Pasteurella multocida* toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. *J Immunol*, 161(10): 5640-6, 1998

Essler M, Retzer M, Bauer M, Heemskerk JW, Aepfelbacher M and Siess W: Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 274(43): 30361-4, 1999

Essler M, Retzer M, Bauer M, Zangl KJ, Tigyi G and 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 N Y Acad Sci, 905: 282-6, 2000

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H and Jürgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL.

Free Rad Biol Med, 13: 341-90, 1992

Falzano L, Rivabene R, Santini MT, Fabbri A and Fiorentini C: An Escherichia coli cytotoxin increases superoxide anion generation via rac in epithelial cells.

Biochem Biophys Res Commun, 283(5): 1026-30, 2001

Fang X, Gaudette D, Furui T, Mao M, Estrella V, Eder A, Pustlink T, Sasagawa T, Lapushin R, Yu S, Jaffe RB, Wiener JR, Erikson JR and Mills GB: Lysophospholipid growth factors in the initiation, progression, metastases and management of ovarian cancer.

Ann N Y Acad Sci, 905: 188-208, 2000

Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C and Boquet P: Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine.

Nature, 387: 729-33, 1997

Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L and Chap H: Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells.

Cell, 80: 919-27, 1995

Fujita A, Saito Y, Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Ushikubi F and Narumiya S: Integrin-dependent translocation of p160ROCK to cytoskeletal complex in thrombin-stimulated human platelets.

Biochem J, 328(Pt3): 769-75, 1997

Fukata Y, Kimura K, Oshiro N, Saya H, Matsuura Y and Kaibuchi K: Association of the Myosin-binding Subunit of Myosin Phosphatase and Moesin: Dual Regulation of Moesin Phosphorylation by Rho-associated Kinase and Myosin Phosphatase

J Cell Biol, 141(2): 409-18, 1998

Fukata Y, Oshiro N and Kaibuchi K: Activation of moesin and adducin by Rho-kinase downstream of Rho.

Biophys Chem, 82(2-3): 139-47, 1999

Gennero I, Xuereb JM, Simon MF, Girolami JP, Bascands JL, Chap H, Boneu B and Sie P: Effects of lysophosphatidic acid on proliferation and cytosolic Ca^{2+} of human adult vascular smooth muscle cells in culture.

Thromb Res, 94: 317-26, 1999

Goetzl EJ and An S: Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate.

FASEB J, 12: 1589-98, 1998

Goetzl EJ, Dolezalova H, Kong Y, Hu YL, Jaffe RB, Kalli KR and Conover CA: Distinctive expression and functions of the type 4 endothelial differentiation gene-encoded G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid in ovarian cancer.

Cancer Res, 59(20): 5370-5, 1999

Goetzl EJ, Kong Y and Mei B: Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate protection of T cells from apoptosis in association with suppression of Bax.

J Immunol, 162, 2049-56, 1999

Gohla A, Harhammer R, Schultz G: The G-protein G_{13} but not G_{12} mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho.

J Biol Chem, 273: 4653-59, 1998

Goldstein JL, Brown MS: The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis.

Annu Rev Biochem, 46:897-930, 1977

Goldstein JL and Brown MS: Regulation of the mevalonate pathway.

Nature, 343: 425-30, 1990

Gonda K, Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Okazaki H, Sakurai T, Kimura S, Sillard R, Harii K and Takuwa Y: The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways. *Biochem J*, 337: 67-75, 1999

Gueguen G, Gaige B, Grevy JM, Rogalle P, Bellan J, Wilson M, Kläebe A, Pont F, Simon MF and Chap H: Structure-activity analysis of the effects of lysophosphatidic acid on platelet aggregation. *Biochemistry*, 38(26): 8440-50, 1999

Guo C, Zheng C, Martin-Padura I, Bian ZC and Guan JL: Differential stimulation of proline-rich tyrosine kinase 2 and mitogen-activated protein kinase by sphingosine 1-phosphate. *Eur J Biochem*, 257: 403-8, 1998

Hall A: Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 10: 31-54, 1994

Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350): 509-14, 1998

Hill CS, Wynne J and Treisman R: The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81(7): 1159-70, 1995

Hiramatsu K, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A: Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis*, 7: 55-60, 1987

Hisano N, Yatomi Y, Satoh K, Akimoto S, Mitsumata M, Fujino MA and Ozaki Y: Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells. *Blood*, 93: 4293-9, 1999

Hla T, Maciag T: An abundant transcript induced in differentiating endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein coupled receptors.

J Biol Chem, 265: 9308-9313, 1990

Hong G, Baudhuin LM and Xu Y: Sphingosine-1-phosphate modulates growth and adhesion of ovarian cancer cells.

FEBS Lett, 460(3): 513-8, 1999

Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D and Lynch KR: Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate.

Mol Pharmacol, 57(4): 753-9, 2000

Inoue CN, Epstein M, Forster HG, Hotta O, Kondo Y and Iinuma K: Lysophosphatidic acid and mesangial cells: implications for renal diseases.

Clin Sci, 96: 431-36, 1999

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M and Narumiya S: Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases.

Mol Pharmacol, 57(5): 976-83, 2000

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG and Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.

J Clin Invest, 52(11): 2745-56, 1973

Jalink K, Hordijk PL and Moolenaar WH: Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator.

Biochim Biophys Acta, 1198: 185-96, 1994

Jalink K, van Corven EJ, Hengeveld T, Morii M, Narumiya S and Moolenaar W: Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho.

J Cell Biol, 126, 801-10, 1994

Katoh K, Kano Y, Amano M, Kaibuchi K and Fujiwara K: Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts.

Am J Physiol Cell Physiol, 280(6): C1669-79, 2001

Kawa S, Kimura S, Hakomori S and Igarashi Y: Inhibition of chemotactic motility and trans-endothelial migration of human neutrophils by sphingosine 1-phosphate.

FEBS Lett, 420, 196-200, 1997

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakanano T, Okawa K, Iwamatsu A and Kaibuchi K: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase).

Science, 273: 245-8, 1996

Kjoller L and Hall A: Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin.

J Cell Biol, 152(6): 1145-57, 2001

Klages B, Brandt U, Simon MI, Schultz G and Offermanns S: Activation of G₁₂/G₁₃ results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets.

J Cell Biol, 144: 745-51, 1999

Knaus UG, Bokoch GM: The p21^{Rac}/Cdc42-activated kinases (PAKs).

Int J Biochem Cell Biol, 30(8): 857-62, 1998

Koh JS, Lieberthal W, Heydrick S and Levine JS: Lysophosphatidic acid is a major serum noncytokine survival factor for murine macrophages which acts via the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway.

J Clin Invest, 102: 716-27, 1998

Kozma R, Ahmed S, Best A and Lim L: The Ras-related protein CDC42Hs and Bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts.

Mol and Cell Biol, 15: 1942-52, 1995

Laufs U, Marra D, Node K and Liao JK: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1).

J Biol Chem, 274(31): 21926-31, 1999

Laufs U, Endres M, Custodis F, Gertz K, Nickenig G, Liao JK and Bohm M: Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription.

Circulation, 102(25): 3104-10, 2000

Laufs U, Endres M, Stagliano N, Amin-Hanjani S, Chui DS, Yang SX, Simoncini T, Yamada M, Rabkin E, Allen PG, Huang PL, Bohm M, Schoen FJ, Moskowitz MA and Liao JK: Neuroprotection mediated by changes in the endothelial actin cytoskeleton.

J Clin Invest, 106(1): 15-24, 2000

Laufs U and Liao JK: Targeting Rho in cardiovascular disease.

Circ Res, 87(7): 616-22, 2000

Leake DS and Rankin S: The oxidative modification of LDL by macrophages.

Biochem J, 270: 741, 1990

Lee H, Goetzl EJ and An S: Lysophosphatidic acid and Sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing.

New York Academy of Sciences Conference on „Lysophospholipids and Eicosanoids in Cancer and in Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases“, P19,1999

Lee MJ, van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T: Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1.

Science, 279(5356): 1552-5, 1998

Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI and Hla T: Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine 1-phosphate.

Cell, 99(3): 301-12, 1999

Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW and Kwon YG: Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun, 264(3): 743-50, 1999

Leeuwen FN, Kain HE, Kammen RA, Michiels F, Kranenburg OW and Collard JG: The guanine nucleotide exchange factor Tiam 1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho.

J Cell Biol, 139(3): 797-807, 1997

Leng L, Kashiwagi H, Ren XD and Shattil SJ: RhoA and the Function of Platelet Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Blood, 91(11): pp4206-15, 1998

Leung T, Chen XQ, Manser E and Lim L: The p160RhoA-binding kinase ROKalpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton.

Mol Cell Biol, 16: 5313-27, 1996

Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E and Lim L: Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization.

Mol Cell Biol, 18(1): 130-40, 1998

Ley K: Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process.

Cardiovasc Res, 32(4): 733-42, 1996

Liao L, Aw TY, Kvietys PR and Granger DN: Oxidized LDL-induced microvascular dysfunction. Dependence on oxidatin procedure.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15(12): 2305-11, 1995

Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S and Proia RL: Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation.

J Clin Invest, 106(8): 951-61, 2000

Luley C und Klör HU: Lexikon Lipoproteine und Atherosklerose.

Aesopus Verlag GmbH, Basel; Knoll AG, Ludwigshafen, 1993

Luo L, Liao YJ, Jan LY and Jan YN: Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev*, 8(15): 1787-802, 1994

Machesky L and Hall A: Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Cell Biol*, 6: 304-11, 1996

Madaule P and Axel R: A novel Ras-related gene family. *Cell*, 42: 31-40, 1993

Mahony JB and Coombes BK: *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: does the evidence support a causal or contributory role? *FEMS Microbiol Lett*, 197(1): 1-9, 2001

Malek RL, Toman RE, Edsall LC, Wong S, Chiu J, Letterle CA, Van Brocklyn JR, Milstien S, Spiegel S and Lee NH: Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors. *J Biol Chem*, 276(8): 5692-9, 2001

Maschberger P, Bauer M, Baumann-Siemons J, Zangl KJ, Negrescu EV, Reininger AJ and Siess W: Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor Src family and Syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem*, 275(25): 19159-66, 2000

Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S and Tsukita S: Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*, 140(3): 647-57, 1998

Mattie M, Brooker G and Spiegel S: Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway.

J Biol Chem, 269(5): 3181-8, 1994

Michell RH and Wakelam MJO: Sphingolipid signalling.
Curr Biol, Vol 4, No 4, 1994

Missy K, Plantavid M, Pacaud P, Viala C, Chap H and Payrastre B: Rho-kinase is involved in the sustained phosphorylation of myosin and the irreversible platelet aggregation induced by PAR1 activating peptide.
Thromb Haemost, 85(3): 514-20, 2001

Moolenaar WH, Kranenburg O, Postma FR and Zondag GCM: Lysophosphatidic acid: G protein signaling and cellular responses.
Curr Opin Cell Biol, 9: 168-73, 1997

Moolenaar, WH: Bioactive lysophospholipids and their G-protein coupled receptors.
Exp Cell Res, 253: 230-8, 1999

Moorman JP, Bobak DA and Hahn CS: Inactivation of the small GTP binding protein Rho induces multinucleate cell formation and apoptosis in murine T lymphoma EL4.
J Immunol, 156(11): 4146-53, 1996

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.
Arteriosclerosis, 4: 357-364, 1984

Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, Kumagai N, Kozaki S, Ushikubi F and Narumiya S: A rho Gene Product in Human Blood Platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation.
J Biol Chem, 267(29): 20921-6, 1992

Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN and Tilly JL: Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy.
Nat Med, 6(10): 1109-14, 2000

Motohashi K, Shibata S, Ozaki Y, Yatomi Y and Igarashi Y: Identification of lysophospholipid receptors in human platelets: the relation of two agonists, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate.

FEBS Lett, 468(2-3): 189-93, 2000

Mukai Y, Shimokawa H, Matoba T, Kandabashi T, Satoh S, Hiroki J, Kaibuchi K and Takeshita A: Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension.

FASEB J, 15(6): 1062-4, 2001

Murphy C, Saffrich R, Grummt M, Gournier H, Rybin V, Rubino M, Auvinen P, Lutcke A, Parton RG and Zerial M: Endosome dynamics regulated by a Rho protein.

Nature, 384(6608): 427-32, 1996

Nakai K, Suzuki Y, Kihira H, Wada H, Fujioka M, Ito M, Nakano T, Kaibuchi K, Shiku H and Nishikawa M: Regulation of myosin phosphatase through phosphorylation of the myosin-binding subunit in platelet activation.

Blood, 90: 3936-42, 1997

Nakamura F, Amieva MR and Furthmayr H: Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets.

J Biol Chem, 270: 31377-85, 1995

Nakamura N, Oshiro N, Fukata Y, Amano M, Fukata M, Kuroda S, Matsuura Y, Leung T, Lim L and Kaibuchi K: Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42.

Genes Cells, 5(7): 571-81, 2000

Narumiya S: The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction.

J Biochem (Tokyo), 120(2): 215-28, 1996

Narumiya S, Ishizaki T and Uehata M: Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632.

Methods Enzymol, 325: 273-84, 2000

Nishioka H, Horiuchi H, Tabuchi A, Yoshioka A, Shirakawa R and Kita T: Small GTPase Rho regulates thrombin-induced platelet aggregation.

Biochem Biophys Res Commun, 280(4): 970-5, 2001

Nobes CD and Hall A: Rho, Rac and CDC42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia.

Cell, 81: 53-62, 1995

Nobes CD, Hawkins P, Stephens L and Hall A: Activation of the small GTP-binding proteins Rho and Rac by growth factor receptors.

J Cell Sci, 108: 225-33, 1995

Nugent D and Xu Y: Sphingosine-1-phosphate: characterization of its inhibition of platelet aggregation.

Platelets, 11(4): 226-32, 2000

Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H and Takuwa Y: Inhibitory regulation of rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3.

Mol Cell Biol, 20(24): 9247-61, 2000

Olorundare OE, Peyruchaud O, Albrecht RM and Mosher DF: Assembly of a fibronectin matrix by adherent platelets stimulated by lysophosphatidic acid and other agonists.

Blood, 98(1): 117-24, 2001

Olson MF, Ashworth A and Hall A: An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1.

Science, 269(5228): 1270-2, 1995

Oshiro N, Fukata Y and Kaibuchi K: Phosphorylation of Moesin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase) Plays a Crucial Role in the Formation of Microvilli-like Structures

J Biol Chem, 273(52): 34663-6, 1998

Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.

Nature, 327: 524-26, 1987

Palmetshofer A, Robson SC and Nehls V: Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells.

Thromb Haemost, 82(5): 1532-7,1999

Panetti TS, Peyruchaud O and Mosher DF: Lysophosphatidic acid and Sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell migration: Involvement of Rho, Ras and PI3-kinase. New York Academy of Sciences Conference on „Lysophospholipids and Eicosanoids in Cancer and in Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases“, P31, 1999

Parizi M, Howard EW and Tomasek JJ: Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase.

Exp Cell Res, 254(2): 210-20, 2000

Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D: Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor.

Arteriosclerosis, 6: 505-510, 1986

Paul BZ, Daniel JL and Kunapuli SP: Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change.

J Biol Chem, 274(40): 28293-300, 1999

Pearson JD: Normal endothelial cell function.

Lupus, 9(3): 183-8, 2000

Pietruck F, Busch S, Virchow S, Brockmeyer N and Siffert W: Signalling properties of lysophosphatidic acid in primary human skin fibroblasts: role of pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 355, 1997

Postma FR, Jalink K, Hengeveld T and Moolenaar WH: Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor.

EMBO J, 15(10): 2388-92, 1996

Price LS and Collard JG: Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion.

Semin Cancer Biol, 11(2): 167-73, 2001

Pyne S and Pyne N: Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors.

Pharmacol Ther, 88(2): 115-31, 2000

Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D: Endothelial cell-derived chemotactic activity for mouse peritoneal macrophages and the effects of modified forms of low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci USA, 82: 5949-53, 1985

Quinn MT, Evans T, Loetterle LR, Jesaitis AJ and Bokoch GM: Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components.

J Biol Chem, 268(28): 20983-7, 1993

Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM and Chisolm GM: Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo.

Circ Res, 80(1): 37-44, 1997

Retzer M, Siess W and Essler M: Mildly oxidised low density lipoprotein induces platelet shape change via Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin light chain and moesin.

FEBS Lett, 466(1): 70-4, 2000

Retzer M and Essler M: Lysophosphatidic acid-induced platelet shape change proceeds via Rho/Rho kinase-mediated myosin light chain and moesin phosphorylation.

Cell Signal, 12(9-10): 645-8, 2000

Ridley AJ and Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.

Cell, 70(3): 389-99, 1992

Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Dieckmann D and Hall A: The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.

Cell, 70: 401-10, 1992

Rizza G, Leitinger N, Yue J, Fischer DJ, Wang DA, Shih PT, Lee H, Tigyi G and Berliner JA: Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction.

Lab Invest, 79: 1227-35, 1999

Rohrer L, Freeman M, Koama T, Penman M, Krieger M: Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger type II.

Nature, 343: 570-572, 1990

Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis – an update.

N Engl J Med, 20: 488-500, 1986

Ross R: Platelet derived growth factor.

Lancet, 1: 1179-1182, 1989

Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease.

N Engl J Med, 340(2): 115-26, 1999

Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA and Collard JG: Rac down-regulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior.

J Cell Biol, 147(5): 1009-21, 1999

Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM and de Lanerolle P: Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase.

Science, 283(5410): 2083-5, 1999

Schmidt G, Sehr P, Wilm M, Selzer J, Mann M and Aktories K: Gln63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1.

Nature, 387: 725-9, 1997

Schulze C, Smales C, Rubin LL and Staddon JM: Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells.

J Neurochem, 68(3): 991-1000, 1997

Segal AW and Abo A: The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes.

Trends Biochem Sci, 18(2): 43-7, 1993

Sekine A, Fujiwara M and Narumiya S: Asparagine residue in the Rac gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase.

J Biol Chem, 264: 8602-5, 1989

Sharestanifar M, Fan X and Manning DR: Lysophosphatidic acid activates NF-kappaB in fibroblasts. A requirement for multiple inputs.

J Biol Chem, 274: 3828-33, 1999

Shaw RJ, Henry M, Solomon F and Jacks T: RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts.

Mol Biol Cell, 9: 403-19, 1998

Siess W: Molecular mechanisms of platelet activation.

Physiol Rev, 69: 58-178, 1989

Siess W: Platelets in the pathogenesis of atherosclerosis.

Adv Exp Med Biol, 273: 119-28, 1990

Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M: Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions.

Proc Natl Acad Sci USA, 96(12): 6931-6, 1999

Siess W, Essler M and Brandl R: Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate: two lipid villains provoking cardiovascular diseases?

IUBMB Life, 49(3): 167-71, 2000

Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U and Pohl U: The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells.

J Biol Chem, 275(25): 18745-50, 2000

Somlyo AP: Rhomantic interludes raise blood pressure

Nature, 389: 908-11, 1997

Steinberg D: Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead.

Arteriosclerosis, 3: 283-301, 1983

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL: Beyond Cholesterol: Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.

N Engl J Med, 320: 915-24, 1989

Steinbrecher P, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL and Steinberg D: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids.

Proc Natl Acad Sci USA, 81: 3883-3887, 1984

Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB: Mechanisms regulating endothelial cell barrier function.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279(3): L419-22, 2000

Stouten PFW, Sander C, Wittinghofer A and Valencia A: How does the switch II region of G-domains work?

FEBS Lett, 320: 1-6, 1993

Sumi T, Matsumoto K, Shibuya A and Nakamura T: Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha.

J Biol Chem, 276(25): 23092-6, 2001

Summersgill JT, Molestina RE, Miller RD and Ramirez JA: Interactions of Chlamydia pneumoniae with human endothelial cells.

J Infect Dis, 181 Suppl 3: S479-82, 2000

Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M, Nakano T, Sasaki Y, Narumiya S, Shiku H and Nishikawa M: Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase.

Blood, 93: 3408-17, 1999

Tapon N, and Hall A: Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton.

Curr Opin Cell Biol, 9(1): 86-92, 1997

Tas PW and Koschel K: Sphingosine-1-phosphate induces a Ca²⁺ signal in primary rat astrocytes and a Ca²⁺ signal and shape changes in C6 rat glioma cells.

J Neurosci Res, 52(4): 427-34, 1998

Terashima T, Yasuda H, Terada M, Kogawa S, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A and Kikkawa R: Expression of Rho-family GTPases (Rac, cdc42, RhoA) and their association with p-21 activated kinase in adult rat peripheral nerve.

J Neurochem, 77(4): 986-93, 2001

Toborek M and Kaiser S: Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis.

Basic Res Cardiol, 94(5): 295-314, 1999

Tokumura A, Iimori M, Nishioka Y, Kitahara M, Sakashita M and Tanaka S: Lysophosphatidic acids induce proliferation of cultured vascular smooth muscle cells from rat aorta.

Am J Physiol, 267: C204-C210, 1994

Tokumura A: A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions.

Prog Lipid Res, 34(2): 151-84, 1995

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M and Narumiya S: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension.

Nature, 389: 990-4, 1997

Usuki K, Heldin NE, Miyazono K, Ishikawa F, Takaku F, Westermark B, Heldin CH: Production of platelet-derived endothelial cell growth factor by normal and transformed human cells in culture.

Proc Natl Acad Sci USA, 86: 7427-31, 1989

Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, Hla T and Spiegel S: Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival.

J Cell Biol, 142(1): 229-40, 1998

Van Brocklyn JR, Graler MH, Bernhardt G, Hobson JP, Lipp M and Spiegel S: Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6.

Blood, 95(8): 2624-9, 2000

Van Dimmer M, Postma F, Hilkmann H, Jalink K, van Broken W and Moolenaar WH: Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca²⁺ signal pathways.

Curr Biol, 8: 8386-92, 1998

Van Hinsbergh WM: Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 17(6): 1018-23, 1997

Van Leeuwen FN, Van Delft S, Kain HE, Van der Kammen RA and Collard JG: Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading.

Nature Cell Biol, Vol.1: 242-8, 1999

Van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, van Hinsbergh VW: Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA.

Circ Res, 83(11): 1115-23, 1998

Van Nieuw Amerongen GP, Vermeer MA and van Hinsbergh VW: Role of Rho A and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction.

Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20(12): E127-33, 2000

Vincent S, Jeanteur P and Fort P: Growth regulated expression of rhoG, a new member of Ras homolog gene family.

Mol Cell Biol, 12: 3138-48, 1992

Wang F, van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S and Spiegel S: Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis.

J Biol Chem, 274(50): 35343-50, 1999

Watson SP, McConnell RT and Lapetina EG: Decanoyl lysophosphatidic acid induces platelet aggregation through an extracellular action.

Biochem J, 232: 61-6, 1985

Weber C, Alon R, Moser B and Springer TA: Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis.

J Cell Biol, 134(4): 1063-73, 1996

Weber C, Lu CF, Casasnovas JM and Springer TA: Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells.

J Immunol, 159(8): 3968-75, 1997

Wilde JJ, Retzer M, Siess W and Watson SP: ADP-induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation.

Platelets, 11(5): 286-95, 2000

Witztum JL: Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis.

Br Heart J, 69(Supplement): 12-18, 1993

Witztum JL: The oxidation hypothesis of atherosclerosis.

The Lancet, 344: 793-95, 1994

Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T and Ridley AJ: Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability.

J Cell Sci, 114(Pt7): 1343-55, 2001

Wu Y, Tomei LD, Bathurst IC, Zang F, Hong CB, Issel CJ, Columbano A, Salley RK and Chien S: Antiapoptotic compound to enhance hypothermic liver preservation.

Transplant, 63: 803-9, 1997

Xu Y, Fang XJ, Casey G and Mills GB: Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells.

Biochem J, 309: 933-40, 1995

Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, Kennedy AW, Belison J, Markman M and Casey G: Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers.

JAMA, 280: 719-23, 1998

Yamaguchi Y, Katoh H, Yasui H, Mori K and Negishi M: RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway.

J Biol Chem, 276(22): 18977-83, 2001

Yang L, Yatomi Y, Hisano N, Qi R, Asazuma N, Satoh K, Igarashi Y, Ozaki Y and Kume S: Activation of protein-tyrosine kinase Syk in human platelets stimulated with lysophosphatidic acid or sphingosine 1-phosphate.

Biochem Biophys Res Commun, 229(2): 440-4, 1996

Yatomi Y, Ruan F, Hakomori SI and Igarashi Y: Sphingosine-1-Phosphate: a platelet-activating sphingolipid released from agonist-stimulated human platelets.

Blood, 86(1): 193-202, 1995

Yatomi Y, Yamamura S, Ruan F and Igarashi Y: Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid.

J Biol Chem, 272(8): 5291-7, 1997

Zheng Y, Kong Y and Goetzl EJ: Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane.

J Immunol, 166(4): 2317-22, 2001

Zondag GC, Postma FR, Etten IV, Verlaan I, Moolenaar WH: Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1.

Biochem J, 330(Pt2): 605-9, 1998

Vorabpublikationen als Co- bzw. Erstautorin:

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden teilweise schon vorab unter meiner Co- bzw. Erst-Autorschaft publiziert:

Bauer M, **Retzer M**, Wilde JI, Maschberger P, Essler M, Aepfelbacher M, Watson SP and Siess W: Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets.

Blood, 94(5): 1665-72, 1999

Essler M*, **Retzer M***, Bauer M, Heemskerk JW, Aepfelbacher M and Siess W.

*** both authors contributed equally**

Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase.

J Biol Chem, 274(43): 30361-4, 1999

Retzer M, Siess W and Essler M: Mildly oxidised low density lipoprotein induces platelet shape change via Rho-kinase-dependent phosphorylation of myosin light chain and moesin.

FEBS Lett, 466(1): 70-4, 2000

Essler M, **Retzer M**, Bauer M, Zangl KJ, Tigyi G and 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 N Y Acad Sci, **905: 282-6, 2000**

Wilde JI, **Retzer M**, Siess W and Watson SP.

ADP-induced platelet shape change : an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation.

Platelets, 11(5): 286-95, 2000

Retzer M and Essler M: Lysophosphatidic acid-induced platelet shape change proceeds via Rho/Rho kinase-mediated myosin light chain and moesin phosphorylation.

Cell Signal, 12(9-10): 645-8, 2000

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber für die Überlassung des Themas, die hilfreichen Anregungen, die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Dr. med. M. Essler für die intensive und geduldige Betreuung bis zum Schluß und für die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. W. Siess für das kontinuierliche Interesse am Fortgang der Arbeit und die Aufnahme ins DFG Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin“:

Allen Mitarbeitern des Instituts für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Lebenslauf

Name	Retzer-Lidl geb. Retzer
Vorname	Michaela
geboren	08.11.1973
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
1980-1984	Grundschule in München
1984-1993	Werner-von-Siemens-Gymnasium, München
Oktober 1993	Beginn des Medizinstudiums an der LMU, München
März 1996	Ärztliche Vorprüfung
März 1997	I. Staatsexamen
seit Dezember 1997	Doktorandin am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der LMU, München
August 1998-August 1999	Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“
März 2000	II. Staatsexamen
Mai 2001	III. Staatsexamen
seit August 2001	ÄiP in der Gastroenterologie am städtischen Krankenhaus München-Neuperlach