

---

**Aus der Abteilung für Pharmakologie  
der Medizinischen Hochschule Hannover  
(Leiter: Prof. Dr. med. Klaus Resch)**

**Charakterisierung der Lysophosphatid Acyltransferase in  
Membranen von T-Lymphozyten**

**Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Hochschule Hannover**

**vorgelegt von  
Sabine Fiesinger-Köhler  
aus Lüchow**

**Hannover 2002**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Ziel der Arbeit	12
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
<u>2.1. Materialien</u>	13
2.1.1. Medien und Puffer	13
2.1.2. Reagenzien und Chemikalien	13
2.1.3. Geräte	15
<u>2.2. Methoden</u>	16
2.2.1. Herstellung von Lysophosphatidylinositol	16
2.2.1.1. Reinigung von Lysophosphatidylinositol	16
2.2.1.2. Varianten zur Phosphatidylinositol-Aufreinigung	17
2.2.1.3. Dünnschichtchromatographie	19
2.2.1.4. Phospholipidbestimmung	20
2.2.1.5. Spaltung von Phosphatidylinositol	22
2.2.2. Isolierung der Plasmamembranvesikel	27
2.2.2.1. Aufbereitung der T-Lymphozyten	27
2.2.2.2. Isolation von Plasmamembranen	28
2.2.2.3. Reinigung der Plasmamembranen	29
2.2.3. Analyse der Plasmamembran-Lösung	30
2.2.3.1. Proteinbestimmung nach BRADFORD	30
2.2.4. Vorbereitungen für den optischen Test	31
2.2.4.1. Ansatz der DTNB-Lösung (ELLMANN-Reagenz)	31
2.2.4.2. Ansatz der Lysoverbindungen	31
2.2.4.3. TRIS-Puffer	32

---

2.2.4.4. Herstellung der Fettsäure-CoA-Verbindung	32
2.2.5 Bestimmung der Acyltransferase-Aktivität	33
2.2.5.1. Prinzip der Messung	33
2.2.5.2. Reagenzien	34
2.2.5.3. Durchführung des Enzymtests	34
2.2.5.4. Berechnung der Enzymaktivität	35
2.2.6. Vorversuche	36
2.2.6.1. Spektrum des DTNB	36
2.2.7. Hemmung der Acyltransferaseaktivität	36
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1. Phosphatidylinositol	38
3.2. Spektrum des ELLMANN-Reagenz	38
3.3. Abhängigkeit der Enzymreaktion von der Konzentration der Lysophosphatidylverbindungen	39
3.3.1. Lysophosphatidylcholin (LPC)	39
3.3.2. Lysophosphatidylethanolamin (LPE)	41
3.3.3. Lysophosphatidylinositol (LPI)	43
3.4. Acyl-CoA-Konzentrationsabhängigkeit der Acyltransferase	45
3.4.1. Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen in LPC	45
3.4.1.1. Einbau von Arachidonyl-CoA in LPC	45
3.4.1.2. Einbau von Oleoyl-CoA in LPC	47
3.4.1.3. Einbau von Palmitoyl-CoA in LPC	48
3.4.2. Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen in LPE	48
3.4.2.1. Einbau von Arachidonyl-CoA in LPE	50
3.4.2.2. Einbau von Oleoyl-CoA in LPE	51

---

3.4.2.3. Einbau von Palmitoyl-CoA in LPE	51
3.4.3. Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen in LPI	51
3.4.3.1. Einbau von Arachidonyl-CoA in LPI	52
3.4.3.2. Einbau von Oleoyl-CoA in LPI	52
3.4.3.3. Einbau von Palmitoyl-CoA in LPI	54
3.5. Hemmung des Acyl-CoA-Einbaus in LPC durch verschiedene Fettsäuren	55
3.5.1. Einbau von Arachidonyl-CoA	55
3.5.2. Einbau von Oleoyl-CoA	57
3.5.3. Einbau von Palmitoyl-CoA	59
3.6. Aktivität der LAT in Plasmamembranen von mitogen stimulierten T-Lymphozyten	60
<b>4. Diskussion</b>	<b>63</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>72</b>
<b>7. Danksagungen</b>	<b>74</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>75</b>
<b>9. Erklärungen</b>	<b>76</b>

## 1. EINLEITUNG

Als Träger immunologischer Funktionen sind die Lymphozyten von zentraler Bedeutung. Man unterscheidet T- und B-Lymphozyten, wobei die T-Lymphozyten für die zellvermittelte Immunität und die B-Lymphozyten für die Antikörperproduktion verantwortlich sind.

Die Zellmembran der Lymphozyten übernimmt zahlreiche wichtige Funktionen. Sie schützt einerseits das Zellinnere gegenüber dem umliegenden Milieu und stellt eine Permeabilitätsbarriere dar, andererseits vermittelt sie den Kontakt zur Umwelt und lässt bestimmte Substanzen in das Zellinnere eintreten.

Zusätzlich gibt es intrazelluläre Membranen, die die Zellen in spezielle Kompartimente (z.B. Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Zellkern) unterteilt. Das heutige gültige Membranmodell ist 1972 von Singer/Nicolson beschrieben worden (Abb. 1).

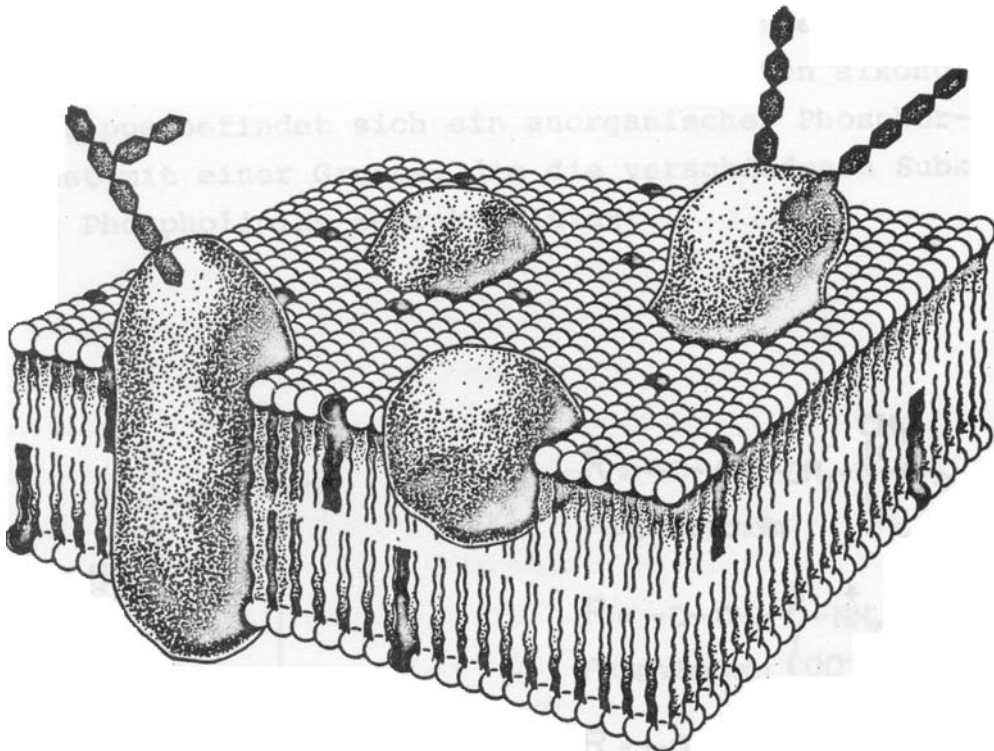


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Membranmodells (Singer, 1972)

Dabei besteht die 60-100 nm dicke Membran zu 40% aus Lipiden und zu 60% aus Proteinen. Die Proteine sind durch elektrostatische und hydrophobe Kräfte mit den Lipiden assoziiert. Sie dienen unter anderem als Transportsystem. Ein geringer Bestandteil (1-5%) fällt auf Kohlenhydrate.

Die Lipide mit ihren hydrophoben und hydrophilen Anteilen bilden eine Doppelschicht (Lipidbilayer), bei der die aliphatischen Ketten zum Inneren der Membran orientiert liegen und die hydrophilen Reste nach außen gerichtet sind.

In den Membranen der T-Lymphozyten stellen die Phospholipide mit 60% den Hauptlipidanteil. Ca. 25% entfallen auf das Cholesterin, 8% auf freie Fettsäuren und 6% auf Triglyzeride (FERBER et al., 1975).

Zu den Phospholipiden gehören die Phosphosphingolipide und die Phosphoglyceride. Die letzteren sind Diacylderivate (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol) und Monoacylderivate (Lysophosphatidylcholin, Lysophosphatidylethanolamin und Lysophosphatidylinositol). In der T-Lymphozytenmembran sind die Phospholipide wie folgt verteilt: 50% Phosphatidylcholin, 20% Phosphatidylethanolamin, 10% Phosphatidylinositol und 10% Phosphatidylserin (GOPPELT & RESCH, 1984).

Über die physikalischen und chemischen Parameter der Phospholipide sind umfangreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Dies hat zum Verständnis der Funktion von Phospholipiden als Membrankomponenten wesentlich beigetragen.

Chemisch handelt es sich bei den Phospholipiden um ein Glycerolgerüst mit veresterten Fettsäuren. In Position 1 sind überwiegend gesättigte Fettsäuren und in Position 2 überwiegend ungesättigte Fettsäuren anzutreffen (FERBER et al., 1975). An der dritten OH-Gruppe des Glycerins befindet sich ein anorganischer Phosphorsäurerest mit einer Gruppe, die die Subklasse der Phospholipide charakterisiert (Abb. 2).

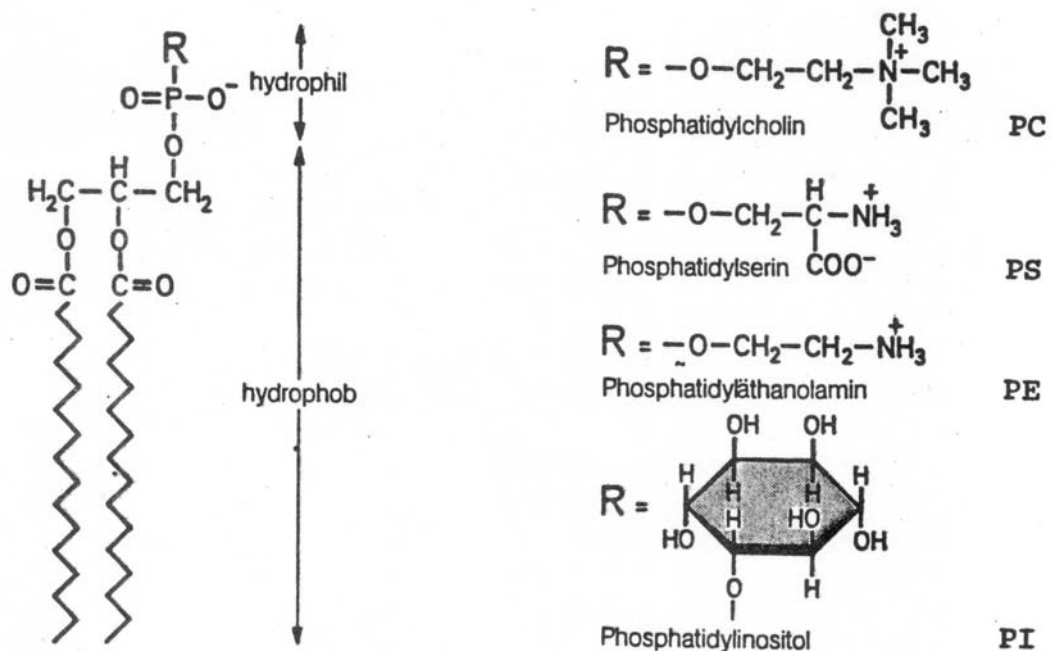


Abbildung 2: Aufbau der Phospholipide

Die veresterten Fettsäuren der Phosphoglyceride haben eine C-Atomanzahl zwischen 14 und 24. Die häufigsten Fettsäuren sind mit  $C_{16}$  bis  $C_{18}$  vertreten. Wenn Doppelbindungen vorliegen, handelt es sich um eine cis-Konfiguration. In Säugetierzellen ist die Arachidonsäure eine vierfach ungesättigte Fettsäure überwiegend mit Glycerolphospholipiden verestert. Der Pool an freier Arachidonsäure wird durch die Balance zwischen Deacylierung und Reacylierung reguliert (IRVINE, 1972). Die Deacylierung wird meistens über

die Phospholipase A1 und A2 katalysiert. Aus Phosphatidylinositol wird Arachidonsäure durch die Phospholipase C aus dem Diacylglycerol freigesetzt. Dieser Stoffwechselweg ist auch für das Phosphatidylcholin von Bedeutung (WOLF & GROSS, 1982; BESTERMAN et al., 1986). Die Reacylierung wird durch zwei Enzyme Diacyl-CoA-Synthetase und die Diacyl-CoA-1-Acylglycerol-3-Phosphoglycerid-O-Acyltransferase (Lysophosphatid Acyltransferase, LAT, EC 2.3.1.23) katalysiert. Die exakte Regulation der Reacylierung ist physiologisch von großer Bedeutung:

1. Freie Fettsäuren und Lysophospholipide können aufgrund ihrer Detergentien-ähnlichen Eigenschaft die Integrität der Membranstrukturen zerstören.
2. Die LAT hat große funktionelle Bedeutung für den Aufbau der Zellmembran. Arachidonsäure wird nicht in Glycerolphospholipide während der De-novo-Synthese inkorporiert, sondern während einer späteren Phase mittels De- und Reacylierung eingebaut.
3. In T-Lymphozyten ist die LAT mit an der mitogen stimulierten T-Zellaktivierung beteiligt. Mitogene wie Concanavalin A können das Enzym aktivieren und Veränderungen der Zusammensetzung der Fettsäuren in den Membran-Phospholipiden bewirken (GOPPELT-STRÜBE et al., 1985).

Trotz der funktionellen Relevanz der Reacylierung im Lipidmetabolismus sind die Enzyme, die an diesem Prozess beteiligt sind, nicht vollständig charakterisiert.

In ersten Arbeiten haben schon Lance und Merkel 1963 festgestellt, dass die Art der Fettsäuren für den Einbau in die Lysoverbindung von großer



Bedeutung ist. Sie zeigten unter anderem in Taubenpankreas-mikrosomen, dass Linolyl-CoA schneller als Oleoyl-CoA in Lysophosphatidylinositol eingebaut wird.

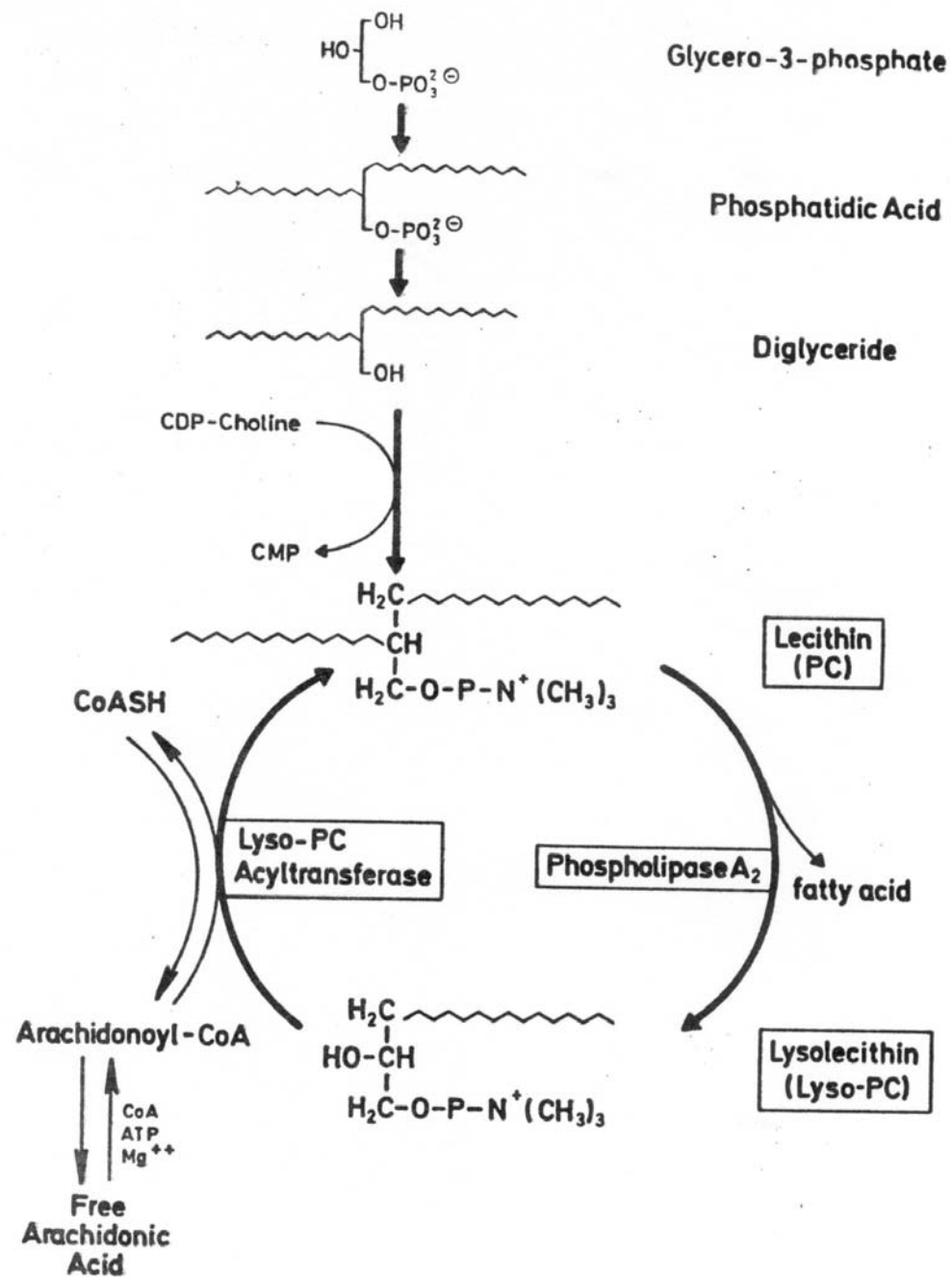


Abbildung 3: Stoffwechselwege des Phospholipidmetabolismus  
De-novo-Synthese und Deacylierungs- und Re-Acylierungskreislauf

Weitere Arbeiten mit Rattenlebermikrosomen (HASEGAVA-SASAKI et al., 1975, LANDS et al., 1982), Rattenlungenmikrosomen (IRITANI et al., 1984) und Mikrosomen aus Mäusegehirnen (WISE et al., 1980) bestätigen den bevorzugten Umsatz von mehrfach ungesättigten Acyl-CoA-Verbindungen im Vergleich zu einfach ungesättigten oder gesättigten Verbindungen.

Die Lysoglycerolphosphatverbindungen spielen ebenfalls als Fettsäure-Akzeptor eine wichtige Rolle. Lands (1963) zeigte einen 10-fach schnelleren Einbau von Oleoyl-CoA und Palmitoyl-CoA in Lysophosphatidylcholin als in Lysophosphatidylinositol.

Miki et al. (1977) konnten die Abhängigkeit der Acyltransferase von der polaren Kopfgruppe der Glycerolipide demonstrieren. Er benannte eine Glycerophosphatidyltransferase und die Acylglycerophosphatidyltransferase und die Acylglycerophosphatidylcholinacyltransferase. Die Fettsäureverteilung wurde auch hier als nicht zufällig beschrieben, sondern auf die verschiedenen Glycerophosphate zurückgeführt.

Bei den bisherigen Untersuchungen zeigten sich technische Probleme. Unter anderem war es nicht möglich, eine exakte kinetische Bestimmung der Michaelis-Menton-Konstante aufgrund einer Substrathemmung des Enzyms bei hohen Konzentrationen vorzunehmen. Die Substrate bildeten auch ab einer bestimmten Konzentration Micellen und wurden an die Mikrosomenproteine oder Lipide gebunden.

Eine technische Verbesserung der Messungen wurde von Ferber und Resch (1973) erreicht. Durch Verwendung von radioaktiv markierten Substraten konnten Enzymkonzentrationen von  $< 10 \mu\text{g}$  verwendet werden. Auch bei

diesen Messungen wurde die Relevanz der Fettsäure für den Einbau in die Phospholipide unterstrichen.

Trotz dieser Fortschritte durch radioaktiv markierte Fettsäuren als Substrat in der Charakterisierung der LAT können wichtige kinetische Parameter von Enzymen, z.B.  $K_M$ -Werte, nur durch optische Enzymmessungen bestimmt werden.

### **1.1. Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode zur optischen Messung der Lysophosphatid Acyltransferase. Mit Hilfe dieser Methodik sollten drei Lysoacylverbindungen als Akzeptor von aktivierten Fettsäuren untersucht werden. Dabei sollte die Präferenz verschiedener Fettsäuren als Acyl-CoA-Verbindungen für die Lysoverbindungen bestimmt werden. Für verschiedene Acyl-CoA-Verbindungen sollten  $K_M$ -Bestimmungen durchgeführt werden. Eine mögliche Modifikation der Reaktion sollte in Anwesenheit von freien Fettsäuren beobachtet werden.

Zu Beginn dieser Arbeit war eine wesentliche Lysoverbindung, das Lysophosphatidylinositol, nicht kommerziell erhältlich. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag somit zunächst in der Generierung der entsprechenden Lysophosphatidylinositol-Verbindung.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien.**

#### **2.1.1. Medien und Puffer**

Hepes: n-2-Hydroxyethylpiperacin-n-2-Ethansulfonsäure von Seromed.

Hepes/KCl: 20 nmol/ml Hepes (4,76 g/l), 150 nmol/ml KCl (10,44 g/l), pH-Werte (7,0/8,0) werden durch Titration mit 1 N NaOH erreicht.

PBS: Phosphate-buffered Selen von Dubeco.

RPMI-Medium für Plasmamembrangewinnung.

#### **2.1.2. Reagenzien, Chemikalien.**

Aluminiumoxyd aktiv-neutral, Aktivitätsstufe 1, Merck Nr. 1077.

Arachidonylchlorid, Nudec Prep.

Arachidonsäure, Sigma.

Albumin, fettsäurefrei, Sigma.

Ammoniumnitrat (Merck).

Butanol, Merck.

Calciumchlorid, Merck.

Chloroform, Merck.

Chromschwefelsäure, Merck.

Co-Enzym A, Reinheitsgrad 1, Nr. 103411, Boehringer.

Concanavalin A, Pharmacia.

Dioxycholol, Merck.

Diethylether, Merck.

Dünnschichtchromatographie-Plastikfolien (Kieselgel), Schleicher & Schüll (S+S, F1500, 20 x 20 cm).

DTNB, Sigma Nr. B-8130.

EDTA, Merck.

Essigsäure, mindestens 96%, Merck.

Ethylalkohol, absolut, Baker analysed Reagent.

Hexan, Merck.

Kaliumchlorid, Merck.

Kieselgel 60 N, Merck.

L- $\alpha$ -Lysophosphatidylcholin, Sigma.

L- $\alpha$ -Lysophosphatidylethanolamin, Sigma.

Lysophosphatidylinositol (pig liver), Seradari-Research-Laboratorys Kat.-Nr. A391.

Magnesiumchlorid, Merck.

2-Mercaptoethanol, Serva.

Methanol, Baker analysed Reagent.

Natriumcholat 3,5%, Merck.

Natriumchlorid, Merck.

Natriumhydrogencarbonat, Merck.

Natronlauge 1 M, Merck.

Natriumsulfid 16,5%, Merck.

Ölsäure Sigma.

Oleoyl-CoA Sigma.

Phosphat-Standardlösung (1  $\mu$ =1 mM Phosphat), Serva, Nr. 39198.

Phosphatidylinositol, Sigma.

Phosphatidylinositol unrein (pseubin), Sigma, Nr. P6636.

Palmitinsäure, Sigma.

Palmitoyl-CoA, Sigma.

Phospholipase, Pankreas, Boehringer, Nr. 161454.

Phospholipase A2, Nr. P-2509, Sigma (Bee Venom).

Salpetersäure 65%ig, Merck, Artikel 456.

Saccharose, Dichtegradientenzentrifugation, Merck.

Salzsäure, Merck.

Schwefelsäure, konz., suprapur, Merck.

Stickstoff, Messer-Griesheim.

Serva-Blau-G (Coomassie-Brillant-Blue), G250, Serva.

Tetrahydrofuran, Merck.

Trypanblaulösung 0,5%ig in physiologischer NaCl-Lösung, Serva.

Wasserstoffperoxyd 6%ig.

### **2.1.3. Geräte.**

Auftragegerät Linomat 2, Fa. Cannei.

Brutschrank Haereus.

Dialyseschläuche, Union-Carbide-Corp. Food-Products-Division, Porengröße ungekocht 15.000, gekocht 11.000.

Druckhomogenisator, Process-Equipment Artesan, Nr. 49871B.

Filterpapier: Schleicher & Schüll, Durchmesser 7 cm, Nr. 597.

Gefriergetrocknungsanlage: L2/70, Nr. 3100, Freeze-Dryer.

Glasküvetten.

Nylonwatte, Leukopack, Fennwall-Lab, Travenol.

Spektralphotometer 21V/VIS-Spektralphotometer 551S, Perkin-Elmer.

Potter B-Braun Mels. AG, geschliffen.

pH-Meter.

Rotationsverdampfer.

Trennkammer für DC-Platten.

Ultrazentrifuge 2870 Beckman mit Rotor 70TI und 65, Beckman Instruments, München.

Ultraschallgerät Labsonic 1510, Braun.

Tischzentrifuge Eppendorf, 3200.

Heraeus-Christ Raumzentrifuge.

Sorvall-Zentrifuge RC2-B, SER72232 mit Roter SS33.

Zählkammer: Brand, improved double Neubauer, Tiefe 0,1 mm, 0,025 mm<sup>2</sup>

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Herstellung von Lysophosphatidylinositol.**

Für die Messung des Fettsäureeinbaus in Lysophosphatidylinositol mußte zunächst die Substanz synthetisiert werden, da sie nicht kommerziell erhältlich war.

#### **2.2.1.1. Reinigung von Phosphatidylinositol.**

Die Ausgangssubstanz für die Lysophosphatidylinositol-Herstellung ist das Phosphatidylinositol, das durch Abspaltung einer Fettsäure zum Monoacylderivat umgesetzt wird.

Die Spaltung wurde mit gereinigtem Phosphatidylinositol durchgeführt.

Prinzip: Das kommerziell erhältliche Phosphatidylinositol war mit anderen Phospholipiden verunreinigt. Um diese (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin) zu entfernen wurde die Phosphatidylinositol-Lösung in Chloroform:Methanol (1:1 (V/V)), chromatographisch gereinigt.

Durchführung: Auf eine 10 cm große Aluminiumoxydsäule wurde die unreine Lösung aufgetragen. Zuvor wurde die Säule mit Chloroform/Methanol 5-mal



mit je einem Milliliter durchgespült. Anschließend wurden verschiedene Lösungsmittel mit zunehmendem Wassergehalt über die Säule gegeben. Die Phospholipide wurden mit steigender Hydrophilie von der Säule eluiert.

Arbeitsschema: Säule mit 5 x 1 ml Chloroform/Methanol 1:1; (V/V) durchspülen.

Auftrag 100 ml der Phospholipid-Lösung (1 mg).

Elution:

1. 5 x 1 ml Chloroform/Methanol (1:1; V/V).
2. 5 x 1 ml Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:1; V/V/V).
3. 5 x 1 ml Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:2; V/V/V).

Die einzelnen Lipidfraktionen wurden qualitativ durch Dünnschichtchromatographie analysiert.

Diese Methode lieferte nur unzureichende Ergebnisse. Im Lösungsmittel 1 wurde Phosphatidylcholin eluiert. Im 2. Schritt erschienen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin. Im 3. Lösungsmittel fanden sich geringe Mengen des gesuchten Phosphatidylinositols zusammen mit Lysophosphatidylethanolamin und Phosphatidylethanolamin.

Eine quantitative Phosphatidylinositol-Analyse erübrigte sich auf Grund der noch bestehenden Verunreinigung durch andere Phospholipide.

#### **2.2.1.2. Varianten zur Phosphatidylinositol-Aufreinigung.**

2.2.1.2.1. Das Aluminiumhydroxyd wurde bei 100°C getrocknet und mit Bidest angereichert. Auf 100 g Aluminiumhydroxyd kamen 10 ml Bidest. Die Aktivierung allein führte zu keinem besserem Ergebnis. Bessere Ergebnisse ergab die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung.

2.2.1.2.2. Die aktivierte Aluminiumoxyd-Säule wurde mit 5 x 1 ml Chloroform:Methanol (1:1; V/V) durchspült. 20 mg verunreinigtes Phosphatidylinositol wurden in 1 ml Chloroform/Methanol gelöst und auf die Säule aufgetragen. Als Lösungsmittel dienten:

Chloroform:Methanol (1:1; V/V) 2 x 1 ml.

Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:1; V/V/V) 2 x 1 ml.

Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:2; V/V/V) 4 x 1 ml.

Chloroform:Ethanol:Ammoniumnitrat (18:25:7; V/V/V) 12 x 1 ml.

In den letzten 8 Schritten wurde Phosphatidylinositol von der Säule gespült. Die gesammelten Proben wurden zusammengegeben, eingeeengt und in 50 µl Chloroform:Methanol (2:1) aufgenommen. Die Gesamtausbeute betrug 3 mg reines Phosphatidylinositol. Das entsprach einer Ausbeute von 15%. Diese Phosphatidylmenge wurde zur weiteren Umsetzung benutzt.

Bei der Spaltung in Lysophosphatidylinositol störte das im Extrakt enthaltene Ammoniumnitrat die anschließende quantitative Bestimmung des Lysophosphatidylinositols. Darum wurde eine neue Lösungsmittelzusammensetzung ohne Ammoniumnitrat erprobt.

2.2.1.2.3.

Zur Extraktion wurden von der Lösung verwendet:

1. Chloroform:Methanol (1:1; V/V) 5 x 1 ml.
2. Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:1; V/V/V) 5 x 1 ml.
3. Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:2; V/V/V) 5 x 1 ml.
4. Ethanol:Chloroform:Bidest (5:2:3; V/V/V) 5 x 1 ml.

Die Lösungsmittel eluierten kein Phosphatidylinositol, deshalb wurde für Phosphatidylinositol der wässrige Anteil im 4. Lösungsmittel erhöht.

Ethanol:Chloroform:Bidest (5:1:5; V/V/V) 5 x 1 ml.

Auch dieser Ansatz mit Erhöhung des Anteils des Bidest im 4. Lösungsmittel führte zu keinem besseren Ergebnis.

#### 2.2.1.2.4.

Durch die Veränderung der Lösungsmittel konnte Phosphatidylinositol nicht von der Aluminiumoxyd-Säule eluiert werden. Daraufhin wurde eine Kieselgel-Säule (60, H; Merck) eingesetzt. Die Silica-Säule wurde mit Chloroform:Methanol (95:5; V/V) vorgespült.

Danach erfolgte der Auftrag der mit anderen Phospholipiden kontaminierten Phosphatidylinositol-Lösung. Die Säule wurde mit Chloroform:Methanol (80:20; V/V) 5 x 1 ml gewaschen und mit Chloroform:Methanol (50:50; V/V) 5 x 1 ml eluiert. Im ersten Schritt wurde Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin eluiert. Im 2. Schritt lösten sich Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin. Die Phosphatidylcholin-Verunreinigung machte die Probe für die anschließenden Spaltungsversuche unbrauchbar.

#### **2.2.1.3. Dünnschichtchromatographie**

Zur qualitativen Überprüfung der Eluate wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet. Die verschiedenen Phospholipide wurden durch Dünnschichtchromatographie (DC) auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit im Laufmittel getrennt (SKIPSHI & BARCLAY, 1969).

Um die Phospholipide zu identifizieren, die von der Aluminiumoxyd-Säule eluiert wurden, wurden die einzelnen Eluate eingeengt und in 50 µl Chloroform:Methanol (2:1; V/V) aufgenommen. Die Proben wurden je 12 mm breit auf DC-Plastik-Folien aufgetragen. Die Folien wurden danach zum Trocknen

in einem Tank im Kühlraum bei 4°C über Nacht gestellt. Der Tank enthielt Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator.

Nach der Vorbehandlung wurden die Dünnschichtchromatographie-Folien in den Tank gestellt, in dem das Laufmittel schon ca. eine Stunde vorher zum Äquilibrieren gestanden hatte. Das Lösungsmittel bestand aus 50 ml Chloroform, 25 ml Methanol, 8 ml Eisessig und 2,5 ml Kochsalz 0,9%ig.

Die Platten wurden nach einer Laufzeit von ca. 120 min bei 4°C aus dem Tank genommen und an der Luft getrocknet. Die einzelnen Lipidfraktionen wurden mittels Joddampf angefärbt und gekennzeichnet. Eine dauerhafte Anfärbung der Lipidfraktionen gelang durch eine Kupfersulfat-Lösung (10%iges Kupfersulfat in 8%iger Phosphorsäure). Die Dünnschichtchromatographie-Platte wurde in saure Kupfersulfat-Lösung getaucht und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min stehen gelassen. Dann wurde sie für 20 min in einem Trockenschrank bei 160°C gelegt. Die einzelnen Phospholipidfraktionen wurden dabei dunkel gefärbt.

#### **2.2.1.4. Phospholidbestimmung.**

Nach der qualitativen Dünnschichtchromatographie mit Nachweis der Phospholipide wurde eine quantitative Bestimmung angeschlossen.

Prinzip: Phospholipide wurden mit Schwefelsäure und Wasserstoffperoxyd zum Phosphat oxidiert. Im Sauren bildet Phosphat mit Molybdat und Malachitgrün einen Farbkomplex, dessen Farbe der Phosphatkonzentration direkt proportional ist.

Reagenzien: Schwefelsäure suprapur.

Wasserstoffperoxyd 6%ig.

Natriumsulfat 16,5% in Bidest.

Ammoniumheptamolybdat 3,5% in Bidest.

Malachitgrünreagenz.

Ansatz: Die Versuche wurden nur in Schraubgläsern durchgeführt, die zuvor mit Chromschwefelsäure gewaschen wurden um alle Phosphatreste zu beseitigen.

In die gereinigten Schraubgläser wurde der Probenleerwert (50 µl HEPES-KCl), die Eichreihe (2-15 µg Phospholipid) sowie die Proben in einem Volumen von 10 und 20 µl pipettiert und komplett eingetrocknet.

Danach wurden folgende Chemikalien zugefügt:

Plus 60 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, gut schütteln. Die Proben werden im Ölbad auf 200°C aufgeheizt.

Plus 25 µl Wasserstoffperoxid, nach 5-minütigem Weiterkochen wurden die entfärbten Proben aus dem Ölbad genommen. Zu den entfärbten Proben wurden 1,5 ml Bidest und 20 µl Natriumsulfat zugegeben.

Von der Lösung wurden jeweils 425 µl in Einmalküvetten pipettiert. Hinzu kamen jeweils 425 µl Bidest, 50 µl Ammoniumheptamolybdat und 100 µl Malachitgrünreagenz. Die Proben wurden gerührt und nach 15 min bei Zimmertemperatur gegen den Leerwert im Zeiss-Spektralphotometer bei 623 nm gemessen.

Auswertung: Die gemessenen Extinktionswerte der Eichgeraden wurden gegen die jeweilige Konzentration graphisch aufgetragen. Die Extinktion der zu untersuchenden Probe wurde auf der Eichgeraden der jeweiligen Konzentration zugeordnet und mit der eingesetzten Verdünnung multipliziert.

### **2.2.1.5. Spaltung von Phosphatidylinositol.**

Phosphatidylinositol wurde durch die Phospholipase A2 in freie Fettsäuren und Lysophosphatidylinositol gespalten. Es wurden verschiedene Ansätze untersucht, um eine optimale Spaltung zu erzielen. Ansätze, bei denen es zu keiner Spaltung kam, wurden im Ergebnisteil nicht dargestellt, sondern in dem folgenden Abschnitt komplett dargestellt.

#### 1. Ansatz:

Phosphatidylinositol wurde mit dem Lösungsmittel Chloroform:Ethanol:NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (18:25:7; V/V/V) von der Aluminiumoxyd-Säule eluiert. Die Phosphatidylinositol-Lösung (2 mg Phosphatidylinositol) wurde im Rotationsverdampfer eingengt. Dann wurden 7ml Diethylether, 70 µl TRIS-HCl pH 9,0 0,1 mM, 70 µl Calciumchlorid 0,1 mM und Phospholipase A2 Boehringer zugefügt. Der Ansatz wurde über Nacht geschüttelt. Nach Zugabe von 7 ml Ethanol wurde die Probe im Rotationsverdampfer eingengt und in 10 ml Chloroform:Methanol (1:1; V/V) aufgenommen. Nach Zugabe von 4,5 ml Bidest und kräftigem Schütteln trat eine Phasentrennung auf. Die unterste Chloroformphase wurde entfernt und aufgehoben (Probe 1). Die wässrige Lösung wurde noch 2-mal mit je 5 ml Chloroform gewaschen (Proben 2 und 3). Die obere wässrige Phase wurde im Rotationsverdampfer eingengt und in Chloroform:Methanol (1:1; V/V) aufgenommen (Probe 4).

Von allen Proben (1-4) wurden je 20 µl auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen und eine Analyse der Phospholipide durchgeführt. Auf der DC-Platte zeigte sich keine Spaltung in Lysophosphatidylinositol, sondern eine starke Verunreinigung. Die quantitative Bestimmung zeigte eine schwarz gefärbte Lösung nach Zugabe des Wasserstoffperoxyds. Auch der

anschließende Versuch die störenden Substanzen durch Trichloressigsäure zu entfernen gelang nicht. Daraufhin wurde eine neue Phosphatidylinositol-Lösung ohne Ammoniumnitrat eingesetzt.

## 2. Ansatz.

Das Phosphatidylinositol, das von der Kieselgelsäule eluiert wurde, war Substrat im 2. Ansatz.

In 4 verschiedenen Reagenzgläsern (A-D), die zuvor mit Chromschwefelsäure gereinigt wurden, wurden je 40 µl Phosphatidylinositol-Lösung unter Stickstoff eingeeengt. In den einzelnen Reagenzgläsern befanden sich folgende Lösungen:

	Phospholipase A2	Calciumchlorid	Bidest	Ethanol	Desoxycholat
A	100 µl	10 µl	-	500 µl	-
B	50 µl	5 µl	-	500 µl	-
C	100 µl	50 µl	315 µl	-	35 µl
D	50 µl	50 µl	365 µl	-	35 µl

Phospholipase A2 bei Zugabe von 100 µl entspricht 10 U Enzymaktivität, bei 50 µl 5 U; Calciumchlorid gleich 10 mM; Desoxycholat gleich 0,1M.

Die Proben A-D wurden für 120 min bei 37° geschüttelt. A und B wurden unter Stickstoff eingeeengt und in 500 µl Chloroform:Ethanol (2:1; V/V) aufgenommen.

C und D wurden in Zentrifugengläser überführt und mit 180 µl 1 N HCl sowie PBS auf 1,5 ml aufgefüllt.

Parallel dazu wurden 3 Standards genauso wie oben beschrieben aufgearbeitet:

1. 50 µl Lipidgemisch.
2. 50 µl natürliches Lipidextrakt.
3. 50 µl verunreinigtes Phosphatidylinositol (10 mg/ml).

1-3 wurden unter Stickstoff eingengt und mit 180 µl 1 M HCl sowie PBS auf 1,5 ml Volumen aufgefüllt.

C und D, 1-3, wurden durch Schütteln mit 1 ml NaCl sowie 1,2 ml Butanol mit nachfolgendem Zentrifugieren extrahiert. Es entstanden 2 Phasen. Die obere Butanolphase wurde abgenommen und butanolgesättigtem Bidest gewaschen. Die untere Phase wurde mit 1,25 ml Butanol gewaschen. Das hergestellte Phosphatidylinositol würde sich bei diesen Lösungsmitteln in Butanol konzentrieren. Deshalb wurden die Butanolphasen und die wässrigen Phasen getrennt. Beide Phasen wurden durch Dünnschichtchromatographie analysiert. Auch von den Proben A und B wurden je 20 µl auf die DC-Platte aufgetragen. Eine Spaltung in Lysophosphatidylinositol und freie Fettsäuren war in diesem Ansatz nicht nachweisbar. Die Proben A und B zeigten auf der Dünnschichtchromatographieplatte nur ungespaltenes Phosphatidylinositol. In den Proben C und D fand sich eine Verunreinigung (wahrscheinlich Desoxycholat). Eine genauere Analyse war damit unmöglich.

### 3. Ansatz.

2 x 40 µl Phosphatidylinositol-Lösung von der Kieselgelsäule (ungefähr 25 µg Phospholipid) wurden unter Stickstoff eingengt. 2 Ansätze wurden pipettiert.



	Phospholipase	Claciumchlorid 10 mM	Diethylether
A	100 µl (10 U)	10 µl	500 µl
B	50 µl (5 U)	5 µl	500 µl

Die Ansätze wurden für 100 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend wurde das gesamte Probenvolumen auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die zu analysierende Lösung enthielt Lyso-phosphatidylinositol und ungespaltenes Phosphatidylinositol. Der gleiche Ansatz wurde mit 50 µg Phosphatidylinositol und 4 Stunden Inkubationszeit wiederholt. Die Spaltung war jedoch nicht reproduzierbar.

#### 4. Ansatz.

In den weiteren Spaltungsversuchen wurde kommerziell erworbenes reines Phosphatidylinositol verwendet. Es wurden 2 x 50 µg unter Stickstoff eingengt, die Probe wurde danach mit Phospholipase A2, Calciumchlorid (10 M), PBS und Diethylether für 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Einengung im Rotationsverdampfer wurden 100 µl Ether hinzugefügt und die Probe auf eine DC-Platte aufgetragen. Eine Spaltung war nicht nachweisbar.

Der Ansatz wurde wie folgt abgewandelt:

50 µg Phosphatidylinositol wurden mit 25 µl Phospholipase, 10 µl Calciumchlorid, 40 µl PBS/Glukose und 200 µl Diethylether für 2 Stunden inkubiert. Der Ansatz zeigte eine Spaltung auf der DC-Platte. Um eine größere Ausbeute zu erhalten wurde die Substratmenge erhöht.

### 5. Ansatz.

5 µg Phosphatidylinositol wurde unter Stickstoff eingeeengt und mit 500 µl PBS, 25 µl TRIS-HCl pH 8, 1 mM, Phospholipase A2 (Bee Venom), 5 ml Diethylether und 125 µl Bidest versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend unter Stickstoff eingeeengt. Nach 3-maligem Waschen mit Diethylether wurde die Ether-Lösung eingeeengt. Die Probe wurde in 1 ml Chloroform:Methanol (2:1; V/V) aufgenommen und auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Reaktion war positiv. Die Phospholipase arbeitete besser im leicht alkalischen Milieu. Die qualitative DC-Platten-Analyse wurde im folgenden quantifiziert. Die Lysophosphatidylinositol-Fraktion wurde von der DC-Platte gekratzt und extrahiert. Auf das Kieselgel wurden 2 ml Methanol gegeben. Nach kräftigem Schütteln und anschließendem Zentrifugieren wurde der Methanolüberstand aufgenommen. Nochmaliges Waschen des Kieselgels mit 1,5 ml Methanol sowie 2 ml Chloroform:Methanol (1:1; V/V) ergab weitere Überstände. Die quantitative Phospholipidbestimmung ergab 0,3 mg Lysophosphatidylinositol. Das entsprach einer 6%igen Ausbeute. Eine detaillierte Analyse jedes Schrittes zeigte, dass der Hauptanteil der Phospholipide in der wässrigen Phase verblieb und somit die Extraktion nicht vollständig war. Versuche, die Extraktion zu verbessern, schlugen fehl. Nach diesem Ergebnis wurde eine komplett modifizierte Methode überprüft.

### 6. Ansatz.

2 mg reines Phosphatidylinositol wurde unter Stickstoff eingeeengt. Dem Phosphatidylinositol wurden 20 µl Phospholipase A2 (Pankreas Boehringer; 0,2 mg), 20 µl TRIS-HCl pH 7,4, 1 M, 40 µl Natriumcholat 3,5% und 50 µl

Bidest zugefügt. Der Ansatz wurde für 3 Stunden bei 37° im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml Methanol gestoppt. Zu dem Ansatz wurden 1 ml Methanol, 2,5 ml Chloroform und 1,75 ml 0,1 M KCl-Lösung zugegeben. Nach 10-minütigem Stehen auf Eis wurden 2 Phasen sichtbar, die nach weiterer Inkubation für 2 min im 60°-Wasserbad sich deutlich voneinander trennten. Die Oberphase wurde abgenommen und aufbewahrt. Von der unteren Phase wurden 50 µl auf einer DC-Platte analysiert. Der Rest wurde eingengt und in 1 ml Chloroform:Methanol (2:1; V/V) aufgenommen. 100 µl dieser Lösung wurden auf die DC-Platte aufgetragen. Im Vergleich zu den Lösungen 1 und 2 wurden unterschiedlich konzentrierte Phosphatidylinositol-Lösungen als Standards auf die DC-Platte aufgetragen (0,6-20 µg Phosphatidylinositol). Eine quantitative Analyse schloß sich an. Dieser Ansatz ergab eine exzellente Spaltung des Phosphatidylinositols. Da Lysophosphatidylinositol zu diesem Zeitpunkt kommerziell angeboten wurde, wurde auf eine Optimierung der Methodik verzichtet.

### **2.2.2. Isolierung der Plasmamembranvesikel.**

#### **2.2.2.1. Aufbereitung der T- Lymphozyten.**

Als T-Lymphozyten wurden Thymozyten vom Kalb verwendet. Der Kalbsthymus stammte vom lokalen Schlachthof. Nach der Entnahme des Thymus wurde dieser in einer Schale mit Medium von Fettgewebe und Blutgefäßen befreit. In allen Versuchen wurde als Medium auf 37°C erwärmtes Hapes-RPMI eingesetzt. Danach wurde der Thymus in kleine Stücke geschnitten. Um die Thymozyten aus dem Gewebe zu gewinnen, wurden 3 der ungefähr 1 cm<sup>2</sup> großen Stücke in einem Potter der Fa. Braun Melsungen

nach Hinzufügen von Medium homogenisiert. Durch vorsichtiges Bewegen des Stempels gingen die Thymozyten in das Medium über. Die Zellsuspension wurde über Nylonwatte filtriert, um noch vorhandene Gewebestücke zu entfernen. Zur Reinigung der Zellen wurden diese zunächst 7 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Zellpellet im RPMI-Medium resuspendiert.

Unter dem Mikroskop wurde mit Hilfe einer Zählkammer die Zellkonzentration bestimmt. Durch Zugabe von 40 µl Tropanblau-Lösung zu einer 40 µl verdünnten Zellsuspension konnte der Anteil der toten Zellen bestimmt werden. Dieser lag bei allen Versuchen unter 5%.

#### **2.2.2.2. Isolation von Plasmamembranen.**

Um aus Thymozyten Plasmamembranen zu gewinnen, wurden die Zellen zum Platzen gebracht. Die einzelnen Schritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. 200 ml der Thymozytensuspension ( $2 \times 10^8$  Zellen/ml) wurden für 20 min bei Überdruck (Stickstoff mit ungefähr 30 Atmosphären) in einer Druckkammer gerührt (Artesan-Pressure-Homogenizer). Die Suspension wurde anschließend in einem Erlenmeyerkolben abgelassen. Durch die Druckentlastung rupturierten die Zellen und aus den Plasmamembranen bildeten sich kleine Membranvesikel.

In einem Erlenmeyerkolben wurde Ethylendiamintetraessigsäure in PBS vorgelegt (Endkonzentration des EDTA 0,1 mM) um eine Aggregation des entstandenen Homogenats entgegen zu wirken.

Um reine Plasmamembranen zu gewinnen, wurde das Homogenat durch verschiedene Zentrifugationsschritte aufgetrennt. Das Homogenat wurde in der Sorvall-Zentrifuge für 20 min bei 18.000 x g zentrifugiert. Das Sediment,

bestehend aus Zellkernen, Mitochondrien, Lysomen und aggregierten Plasmamembranen wurde verworfen. Der Überstand wurde für 30 min bei 17.500 x g erneut zentrifugiert. Der entstandene partikelfreie Überstand mit zytoplasmatischen Proteinen wurde nicht mehr benötigt. Das Sediment mit den Mikrosomen und im Vesikel eingeschlossenen Proteinen wurde mittels einer Insulinspritze in 10 mM Hepes-Lösung (pH 7,0) resuspendiert. Durch diese hypotone Behandlung wurden zytoplasmatische Proteine aus den Vesikeln freigelegt. Eine erneute Zentrifugation dieser resuspendierten Mikrosomen-Protein-Lösung für 60 min bei 17.500 x g führte zur Sedimentation der Mikrosomen. Diese Mikrosomen sind eine Mischung aus endoplasmatischem Reticulum, Ribosomen, Golgi-Apparat und Plasmamembranvesikeln. Diese wurden in Hepes-KCl (20 mM Hepes, 140 mM KCl, pH 7,0) aufgenommen. Durch Gradientenkonfiguration dieser Mikrosomenlösung in einem diskontinuierlichem Saccharose-Gradienten erhielt man die Plasmamembranen. Dazu wurden die Mikrosomen auf eine Saccharose-Lösung (35% B/V) geschichtet und mit 20 mM Hepes-KCl, pH 7,0, aufgefüllt. Nach der Zentrifugation bei 250.000 x g für 2 Stunden war die Fraktion der Plasmamembranen als Bande zwischen Puffer und Saccharose erkennbar. Mit einer Pasteurpipette wurden die Plasmamembranen aufgenommen. Die Reste der Mikrosomen-Lösung hatten sich am Boden des Zentrifugationsröhrchens abgesetzt und wurden verworfen.

### **2.2.2.3. Reinigung der Plasmamembranen.**

Die Plasmamembran-Lösung enthielt eine gewisse Verunreinigung an Saccharose. Zur Elimination der Saccharose wurde eine Dialyse der Plasmamembran-Lösung über Nacht (12-18 Stunden) gegen einen kontinuierlichen

Gradienten durchgeführt. Die Membranen wurden in Dialyseschläuche gefüllt und in eine 20%ige Saccharose-Lösung (W/W-Puffer) gelegt. Am Boden des Dialysiergefäßes wurde mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min HEPES-Lösung mit einem pH-Wert von 7,0 zugeführt und oben die gleiche Menge abgepumpt. Ein Magnetrührer sorgte für ständige Durchmischung. Insgesamt wurde mit einem Volumen von 2 l Puffer dialysiert.

Die auf diese Weise aufgereinigten Plasmamembran-Lösungen wurden direkt verwendet oder bei -80°C tiefgefroren.

### **2.2.3. Analyse der Plasmamembran-Lösung.**

#### **2.2.3.1. Proteinbestimmung nach BRADFORD.**

Um einen Anhalt für die eingesetzte Plasmamembranmenge zu bekommen, wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von BRADFORD bestimmt.

Prinzip: Coomassie-Brillantblau G250 färbt Proteine an. Die Extinktion ist proportional zur eingesetzten Proteinmenge.

Die Reagenz-Lösung bestand aus 10 mg Serva-Blau G, 5 ml Ethanol (95%), 10 ml Phosphorsäure (85%) und 100 ml Aqua bidest. Von der frisch angesetzten Reagenz-Lösung wurden im Test 900 µl eingesetzt. Als Eichreihe wurde fettfreie Albumin-Lösung verwendet. Der Proteingehalt dieser Eichreihe lag in einem Bereich von 6,25 µg bis 100 µg Protein (in 100 µl).

Als Leerwert wurde der Puffer verwendet, in dem die Plasmamembranen und das Albumin gelöst waren (HEPES-KCl, pH 8,0). 5 Minuten nach Mischen des Reagenz (900 µl) und der Probe (100 µl) wurde die Extinktion im Zeiss-Spektralphotometer bei 495 nm gegen den Leerwert gemessen. Der Proteingehalt der Probe ergab sich aus der Eichkurve. Der bestimmte Wert

wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Für jede Bestimmung wurden Doppel- oder Dreifachwerte gemessen.

#### **2.2.4. Vorbereitungen für den optischen Test.**

##### **2.2.4.1. Ansatz der DTNB-Lösung (ELLMANN-Reagenz).**

Für den optischen Test benötigte man ein Reagenz, das mit SH-Gruppen reagiert. Dafür eignete sich 5,5-Dithiobis-(2,4-Nitrobenzoikazid) (DTNB). Es wurde eine 10 mM Lösung verwendet. Das entsprach bei einem Molekulargewicht von 396,4 g/mol 39,64 mg für 10 ml Lösungsmittel. Als Lösungsmittel wurde Bidest verwendet. Der Test sollte bei pH 7,5 durchgeführt werden. Da gelöstes DTNB einen pH-Wert von 1,0 hat, wurde der pH-Wert mittels Natriumhydrogencarbonat-Lösung auf den oben angegebenen pH eingestellt. Dazu wurden die beiden kristallinen Substanzen DNTB (39,64 mg) und Natriumhydrogencarbonat (47 mg) abgewogen und in Chloroform gelöst. Nachdem das Chloroform unter Stickstoff vollständig verdampft war, wurden 10 ml Bidest zugefügt. Nach kräftigem Schütteln wurde die Lösung filtriert, um in der Lösung vorhandene DTNB-Partikel zu entfernen, die den optischen Test stören könnten.

Die Lösung wurde unter Lichtschutz bei 4°C gelagert. Unter diesen Bedingungen betrug die Halbwertszeit ca. 3 Tage. Danach wurde die Lösung durch Oxidationsvorgänge intensiv gelb gefärbt und war damit unbrauchbar.

##### **2.2.4.2. Ansatz der Lysoverbindungen.**

Bei den Lysoverbindungen handelt es sich um hydrophobe Substanzen. Für den optischen Test mußten sie im wässrigen Milieu gelöst werden. Die Suspensionen wurden dann im Test eingesetzt.

Lysophosphatidylcholin: Die Endkonzentration im Ansatz sollte 50 nmol/ml betragen. Von der 10-fach konzentrierten Stammlösung (1 mg/ml) wurden 500 µl in einem Rotationsverdampfer eingeeengt. Nach Zugabe von 2 ml HEPES-KCl, pH 8,0, wurde die Lösung geschüttelt und durch Ultraschallbehandlung (3 x 10 sec.; 40 W) das Lysophosphatidylcholin in Lösung gebracht. Die Lösung wurde für jeden Test neu angesetzt.

Lysophosphatidylethanolamin: Die Endkonzentration sollte 200 nmol/ml betragen. Es wurde eine 10-fach konzentrierte Stammlösung hergestellt. 250 µl der Stammlösung (1 mg/ml in Chloroform:Methanol) wurden im Rotationsverdampfer eingeeengt. Das LPE wurde in 500 µl Bidest gelöst. Um eine klare Lösung zu erhalten wurde diese im Wasserbad bei 60°C erwärmt.

Lysophosphatidylinositol: Die Endkonzentration sollte 30 nmol/ml betragen. Von der 10-fach konzentrierten Stammlösung (0,5 mg/ml) wurden 250 µl eingeeengt und in 1 ml Bidest gelöst. Dazu wurde die Suspension kräftig auf dem Rüttler geschüttelt.

#### **2.2.4.3. TRIS-Puffer.**

Um den für den Test erforderlichen pH von 7,5 zu erhalten, wurde TRIS als Puffer verwendet. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure eingestellt. Die Endkonzentration im Ansatz war 50 mM.

#### **2.2.4.4. Herstellung der Fettsäure-CoA-Verbindung.**

Die eingesetzten Acyl-CoA-Lösungen Oleoyl-CoA und Palmitoyl-CoA wurden kommerziell erworben und in den benötigten Konzentrationen bei -80°C tiefgefroren.



Die Arachidonyl-CoA-Verbindung wurde im Labor synthetisiert (REIZ et al. 1968). Zur Synthese wurden 200 ml Tetrahydrofuran (THF) frisch über Natriumborhydrit destilliert. 50 ml THF/H<sub>2</sub>O 7:3 wurden mit Stickstoff überblasen. Es wurde 50 mg Co-Enzym A-SH als Substrat zugegeben. Der pH von 8,0 wurde kontinuierlich mit 1 M NaOH-Lösung eingestellt. Arachidonylchlorid (0,5 ml auf THF) wurde 50 µl-weise zugegeben. Danach wurde 10%ige Perchlorsäure bis zu einem pH von 3,0 zutitriert. Am Rotationsverdampfer wurde THF entfernt, 0,75 ml 10%ige HClO<sub>4</sub> zugegeben und das Thioesterprezipitat zunächst abzentrifugiert und dann 2-mal durch Zentrifugation mit Diethylether gewaschen. Zuletzt wurde das Präzipitat in HEPES-KCl aufgenommen und bei -80°C tiefgefroren.

### **2.2.5. Bestimmung der Acyltransferase-Aktivität.**

Bei den Acyltransferasen handelt es sich um ein membrangebundenes Protein, das aktivierte Fettsäuren in Lysoacylverbindungen inkorporiert (siehe Einleitung). Der Einbau wurde optisch gemessen.

#### **2.2.5.1. Prinzip der Messung.**

Durch die Acylierung der Fettsäure-CoA-Verbindung wurde Co-Enzym A-SH freigesetzt. Die freien Sulfidrylgruppen konnten mit DNTB zu einem Nitrocarboxidthiolphenol reduzieren. Dies bewirkt eine Zunahme der Extinktion, die im Spektralphotometer gemessen wurde. Die kontinuierliche Zunahme der Extinktion wurde bei 412 nm und 37°C unter physiologischen Bedingungen gemessen. Da die Hydrolyse der Co-Enzym A-Verbindung als Nebenreaktion unabhängig von der Enzymreaktion stattfand, mußte bei jeder Re-

aktion gegen einen Leerwert gemessen werden. Dies war besonders gut in dem Doppelspektralphotometer möglich.

#### **2.2.5.2. Reagenzien.**

Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 1 ml.

1. Puffer: TRIS (50 mM).
2. Reagenz (DNTB) (siehe 2.2.4.1).
3. Acyl-CoA-Verbindungen verschiedener Konzentrationen.
4. Plasmamembran-Lösung: bei LPC 20-40 µg Protein bei LPE 40-80 µg Protein, bei LPI 40-60 µg Protein.
5. Bidest.
6. Lysoverbindung: LPC 50 nmol/ml.  
LPE 200 nmol/ml.  
LPI 33 nmol/ml.

#### **2.2.5.3. Durchführung des Enzymtests.**

In 2 Glasküvetten wurden Puffer, DTNB, Acyl-CoA-Verbindung, Plasmamembranen und Bidest pipettiert. Proben- und Leerwert-Küvette wurden in das Spektralphotometer gestellt. Im Photometer betrug die Temperatur 37°C. Nach ca. 4-5 min betrug die Temperatur in den Küvetten 37°C. Durch Zugabe der Lysoverbindung wurde die Reaktion gestartet und die Zunahme der Extinktion auf einem angeschlossenen Schreiber registriert. Nach 8-12 min konnte die nächste Probe gemessen werden.

Tabelle 1: Beispiel eines Pipettierschemas für Ara-CoA-LPC-Reaktion

	Puffer	DTNB	Ara-CoA	PM	Bidest	LPC
Probe	140 µl	70 µl	70 µl	20 µl	ad 700 µl	70 µl
Leerwert	140 µl	70 µl	70 µl	20 µl	ad 700 µl	-

Ara-CoA, Arachidonyl-CoA; PM, Plasmamembran; LPC, Lysophosphatidylcholin. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Lysophosphatidylcholin gestartet.

#### 2.2.5.4. Berechnung der Enzymaktivität.

Die Enzymaktivität wurde aus der Anfangssteigung der Enzymreaktion berechnet.

Die Aktivität der Acyltransferase konnte durch folgende Gleichung ermittelt werden:

$$\text{Umsatz/min} = \Delta E / \text{min} \times \text{Vol.}_{\text{Küvette}} / E \times d \times \text{Vol.}_{\text{Probe}}$$

$$\Delta E / \text{min} = \text{Extinktionsänderung/min.}$$

$$\text{Vol.}_{\text{Küvette}} = \text{Gesamtvolumen der Küvette in } \mu\text{l.}$$

$$E = \text{Extinktionskoeffizient (16.000 x l x Mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{)}.$$

$$d = \text{Schichtdicke (1 cm).}$$

$$\text{Vol.}_{\text{Probe}} = \text{Volumen der Probe in } \mu\text{l.}$$

$$\text{Konz.}_{\text{Probe}} = \text{eingesetzte Plasmamembranprotein-Konzentration in } \mu\text{g/ml.}$$

$$\text{Im Zähler Umsatz, im Nenner mg Protein x min} = \Delta E / \text{min} \times 1 / \varepsilon \times V_{\text{Küvette}} / V_{\text{Probe}} \times \text{Konz.}_{\text{Probe}} \times 1 / d \text{ [Mol/mg Protein/min]}$$

#### Auswertung der Enzymtests

Die Zunahme der Extinktion wurde auf einem angeschlossenen Schreiber registriert. Unter Berücksichtigung von Papierschub und Spreizung wurde die

Änderung der Extinktion/min errechnet. Der ermittelte Wert wurde zur eingesetzten Plasmaproteinkonzentration und den Extinktionskoeffizienten in Korrelation gesetzt.

## **2.2.6. Vorversuche.**

### **2.2.6.1. Spektrum des DTNB.**

Für die nachfolgenden Versuche war es erforderlich, einen optimalen Wellenlängenmeßbereich zu ermitteln. Dazu wurden 2 Küvetten verwendet, in denen sich folgende Substanzen befanden: 200 µl Puffer, 790 µl Bidest und 10 µl DTNB. In die Probenküvette wurden 5 µl Mercaptoethanol pipettiert. Sofort wurde das DTNB vollständig umgesetzt. Die Extinktion dieser maximal umgesetzten Lösung wurde in einem Wellenlängenbereich von 370-540 nm gemessen.

### **2.2.7. Hemmung der Acyltransferaseaktivität.**

Der Einbau von Acylgruppen in Lysophosphatidylcholin war u.a. von der zugeführten Acylgruppe, ihren Eigenschaften und ihrer Konzentration abhängig. Es stellte sich daher die Frage, ob eine gleichzeitig zugeführte Menge einer anderen oder der gleichen Fettsäure in der Lage war, die Reaktion zu beeinflussen.

Wie unter 2.2.5.1. beschrieben, wurden Proben und Leerwertküvetten gegeneinander gemessen. Als erstes wurde die Acyltransferaseaktivität in Abhängigkeit von Arachidonyl-CoA-, Oleoyl-CoA- und Palmitoyl-CoA-Konzentration gemessen. Diese Ausgangsreaktionen wurden in den folgenden Tests durch Zugabe von Fettsäuren verglichen. Es wurden jeweils Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

Die Änderung des Umsatzes pro Minute und mg Protein wurde ausgerechnet und in Abhängigkeit von der Acyl-CoA-Konzentration graphisch dargestellt.

#### **2.2.8. Messung der Acyltransferaseaktivität nach Mitogenaktivierung der Lymphozyten.**

Zur Frage der Änderung der Enzymaktivität der Lysophosphatid Acyltransferase nach Stimulation der Thymozyten wurden die Kalbsthymozyten mit dem Concanvalin A der Fa. Pharmacia in einer Konzentration von 5 µg/ml inkubiert. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese Konzentration optimal zur Aktivierung der T-Lymphozyten ist. Die Thymozyten wurden für 30 und 120 Minuten mit oder ohne Concanavalin A inkubiert. Danach wurden die Plasmamembranen nach der unter 2.2.2. beschriebenen Methodik präpariert.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Phosphatidylinositol.**

Lysophosphatidylinositol (LPI), das für die Untersuchung zur Spezifität der LAT bezüglich der Lysophosphatid-Akzeptanz benötigt wurde, war zu Beginn der Untersuchungen kommerziell nicht erhältlich. Ziel des ersten Teils der Untersuchungen war deshalb, LPI durch Abspaltung der Fettsäure an der 2. Position aus dem Phosphatidylinositol zu synthetisieren.

Die unter 2.2.1.5. geschilderten Spaltungsversuche waren bis auf den 6. Ansatz unbefriedigend. Nachdem das Reaktionsmilieu abgeändert war (pH 7,4; kein Calcium) und die Phospholipase aus anderer Quelle (Pankreas Boehringer Phospholipase anstatt Bee venom Sigma) eingesetzt wurde, war die Spaltung positiv. Eine dünnschichtchromatographische Analyse auf einer DC-Platte mit Phosphatidylinositol-Standard ergab eine gute Spaltung. Der Phosphatidylinositolrest betrug chromatographisch 2 µg. Das ergab sich aus den Vergleichen mit den PI-Standards. Dieser PI-Rest ließ auf eine 98%ige Spaltung schließen. Die folgende quantitative Analyse ergab jedoch bei einem Einsatz von 2 mg Phosphatidylinositol nur 0,56 mg LPI. Auf eine weitere Optimierung der Methode wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet, da LPI kommerziell angeboten wurde. Entsprechend war die Synthese ausreichender Mengen von LPI nicht mehr von Bedeutung.

#### **3.2. Spektrum des ELLMANN-Reagenz.**

Wie unter 3.6.1. beschrieben, wurde zunächst der optimale Bereich der Extinktionsänderung für DTNB ausgetestet. Dabei wurde in einem Wellenlängenbereich von 370-450 nm die Änderung der Extinktion einer vollständig umgesetzten DTNB-Lösung gemessen.

Das umgesetzte DTNB hatte ein Extinktionsmaximum bei 412 nm. Alle weiteren Versuche wurden mit der konstanten Wellenlänge 412 nm gemessen.

### 3.3. Abhängigkeit der Enzymreaktion von der Konzentration der Lyso-phosphatidylverbindungen.

#### 3.3.1. Lysophosphatidylcholin.

Für die optischen Messungen wurden Konzentrationsbereiche aus den radioaktiven Tests verwendet (Abb. 4).

spez. Aktivität

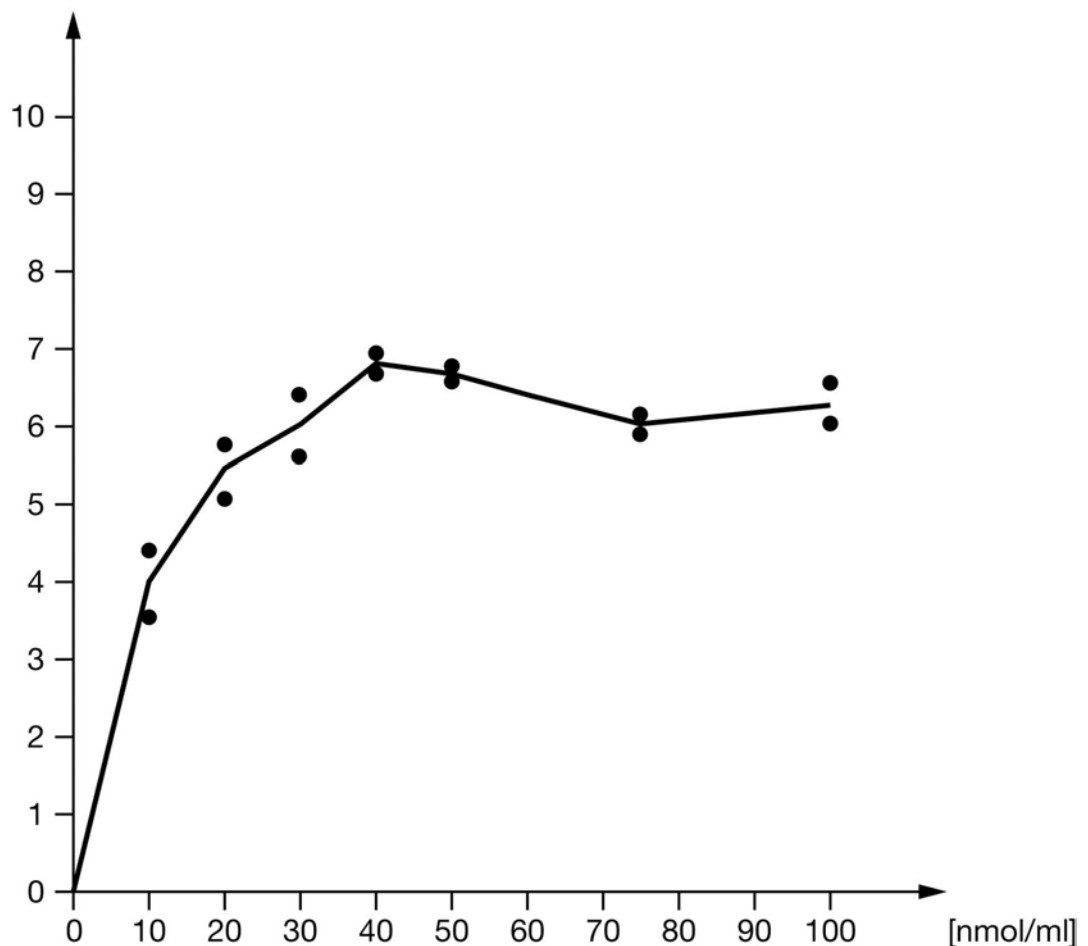


Abb. 4: Radioaktive Bestimmung der Aktivität der LAT.

Die enzymatische Aktivität wurde wie in Material und Methoden mit radioaktiv markierter Arachidonyl-CoA und LPC bestimmt.

Der Vorteil der optischen Messung besteht in der Möglichkeit, verschiedene Lysophosphatidylcholin-Konzentrationen parallel zu messen. Der Konzentrationsbereich des Lysophosphatidylcholin (LPC) lag zwischen 5 und 100 nmol/ml (Abb. 5), der Einbau von Arachidonyl-CoA stieg mit wachsender LPC-Konzentration an.

nmol/min/mg Protein

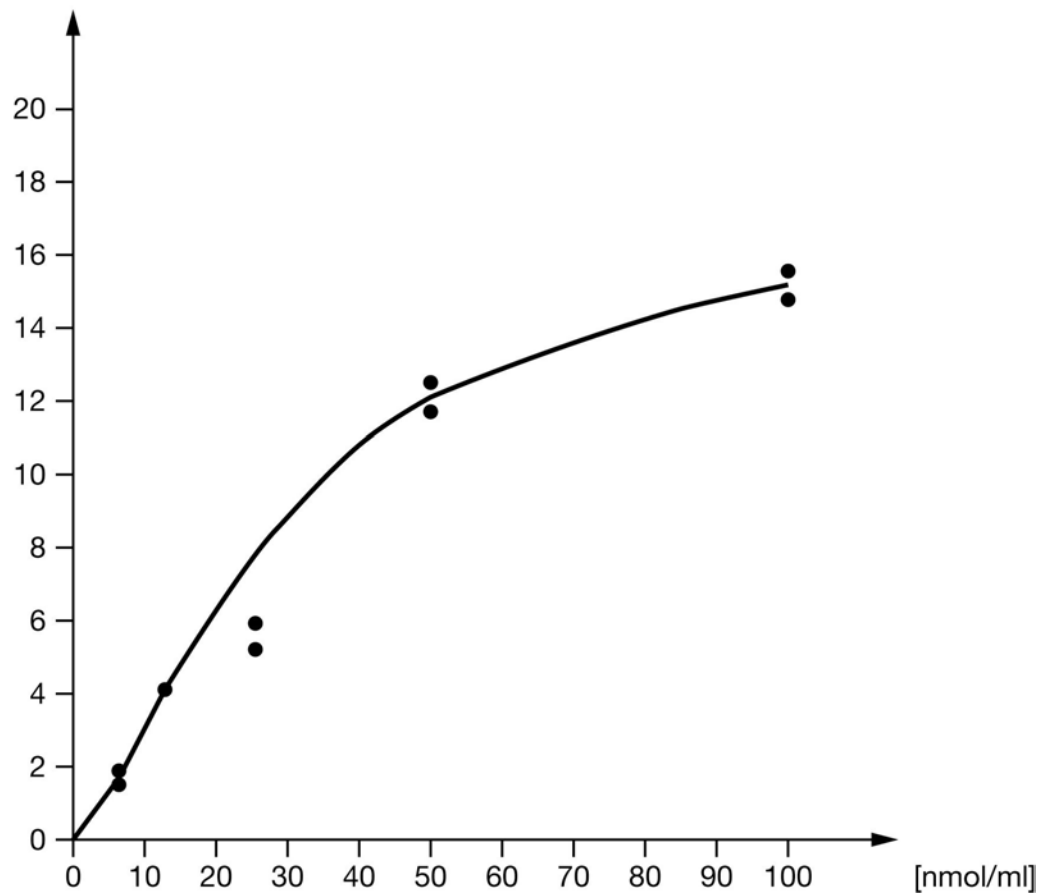


Abb. 5: Effekt der LPC-Konzentration auf die Aktivität der LAT.

Die enzymatische Aktivität wurde wie in Material und Methoden mit Arachidonyl-CoA (20 nmol/ml) als Substrat und bei verschiedenen Konzentrationen LPC als Lyso-Akzeptor bestimmt.

Zwischen 50 und 100 nmol/ml kam der Arachidonyl-CoA-Einbau in den Sättigungsbereich. Entsprechend wurde für die weiteren Messungen die LPC-Konzentration von 50 nmol/ml gewählt.



Die optische Messung und der radioaktive Test zeigten im Kurvenverlauf eine sehr gute Übereinstimmung.

### **3.3.2. Lysophosphatidylethanolamin**

Die Ermittlung der Lysophosphatidylethanolamin- (LPE) Konzentrationsabhängigkeit war mit verschiedenen Problemen verbunden. Die eingesetzte Plasmamembranmenge wurde auf 40-80 µg Protein verdoppelt, da bei geringeren Proteinmengen keine Reaktion meßbar war. Als Substrat der Reaktion wurde Arachidonyl-CoA (22 nmol/ml) verwendet.

Der Arachidonyl-CoA-Einbau in LPE verlief im ausgetesteten Konzentrationsbereich (50-400 nmol/ml LPE) nahezu linear, ohne dass ein Sättigungsverhalten feststellbar war (Abb. 6).

Die Erhöhung der LPE-Konzentration war mit dem optischen Meßverfahren nicht möglich, da die LPE-Lösung als hydrophobe Substanz eine trübe Suspension bildete. Die optische Messung wurde durch die Suspensionsbildung gestört und Experimente, die mit der opaleszierten Suspension durchgeführt worden, zeigten an Stelle der erwarteten Zunahme der Extinktion eine Abnahme. In Bidest bildet das hydrophobe LPE eine Mizellenform und LPE liegt damit in einer räumlichen Anordnung vor, die keinen Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen erlaubte.

Detergenzien, die LPE in Lösung bringen, konnten nicht verwendet werden, da diese die optische Reaktion störten. Die LPE-Lösung wurde daher für den Test einer besonderen Behandlung zugeführt. Die Lösung wurde kurzfristig auf 60°C im Wasserbad erhitzt. Dadurch wurde die Suspension klar und konnte eingesetzt werden.

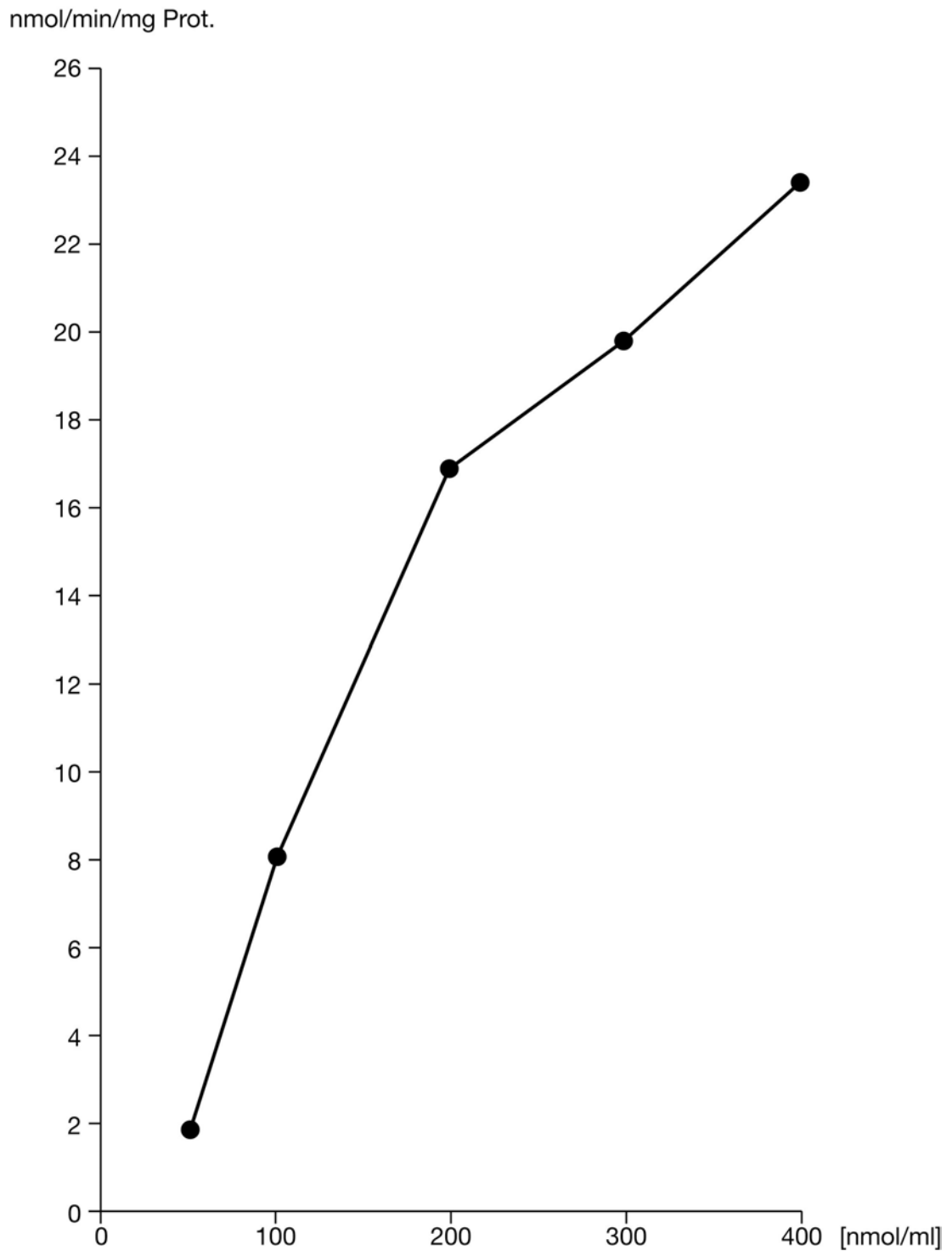


Abb. 6: Effekt der LPE-Konzentration auf die Aktivität der LAT.

Die enzymatische Aktivität wurde wie in Material und Methoden mit Arachidonyl-CoA (22 nmol/ml) als Substrat und bei verschiedenen Konzentrationen LPE als Lyso-Akzeptor bestimmt.

Die gemessene Konzentrationsabhängigkeit zeigte bis 400 nmol/ml keine Sättigung. Bei optisch klarer Lösung konnte dieser Effekt mehrfach reproduziert werden. Entsprechend ist trotz hoher Nominalkonzentration von einer geringen Verfügbarkeit des LPE auszugehen.

Für die weiteren Acyl-CoA-Einbauexperimente wurde eine LPE-Konzentration von 200 nmol/ml verwendet, da es unmöglich war, in höheren Konzentrationsbereichen eine klare LPE-Lösung für längere Zeit herzustellen.

### **3.3.3. Lysophosphatidylinositol**

Die Reaktion der Acetyltransferase in Abhängigkeit von der Lysophosphatidylinositol- (LPI) Konzentration wurde mit Arachidonyl-CoA (22 nmol/ml) und einer Plasmamembran-Konzentration von 40-60 µg Protein untersucht (Abb. 7).

Ähnlich der LPC-Konzentration zeigte sich auch für LPI ein Sättigungsverhalten. Das Enzym erreichte bei 30 nmol/ml LPI den optimalen Umsatz bzw. den maximalen Einbau von Arachidonyl-CoA in die Lysoverbindung.

Die stets neu angesetzte LPI-Lösung veränderte ihre Eigenschaften mit der Zeit. Die frisch angesetzte Lösung zeigte einen anderen Umsatz als eine Lösung die bereits 30 Minuten bei Raumtemperatur im Labor stand. Die Umsatzraten nahmen bei Raumtemperatur innerhalb der ersten Stunde nach dem Ansetzen der LPI-Lösung ständig zu, um sich nach 30-120 Minuten zu stabilisieren. Es dürfte sich hierbei um eine Umordnung innerhalb der LPI-Mizellen unter Raumtemperaturbedingungen handeln.

Alle LPI-Reaktionen wurden daraufhin 2 Stunden nach dem Ansatz der LPI-Lösung durchgeführt.

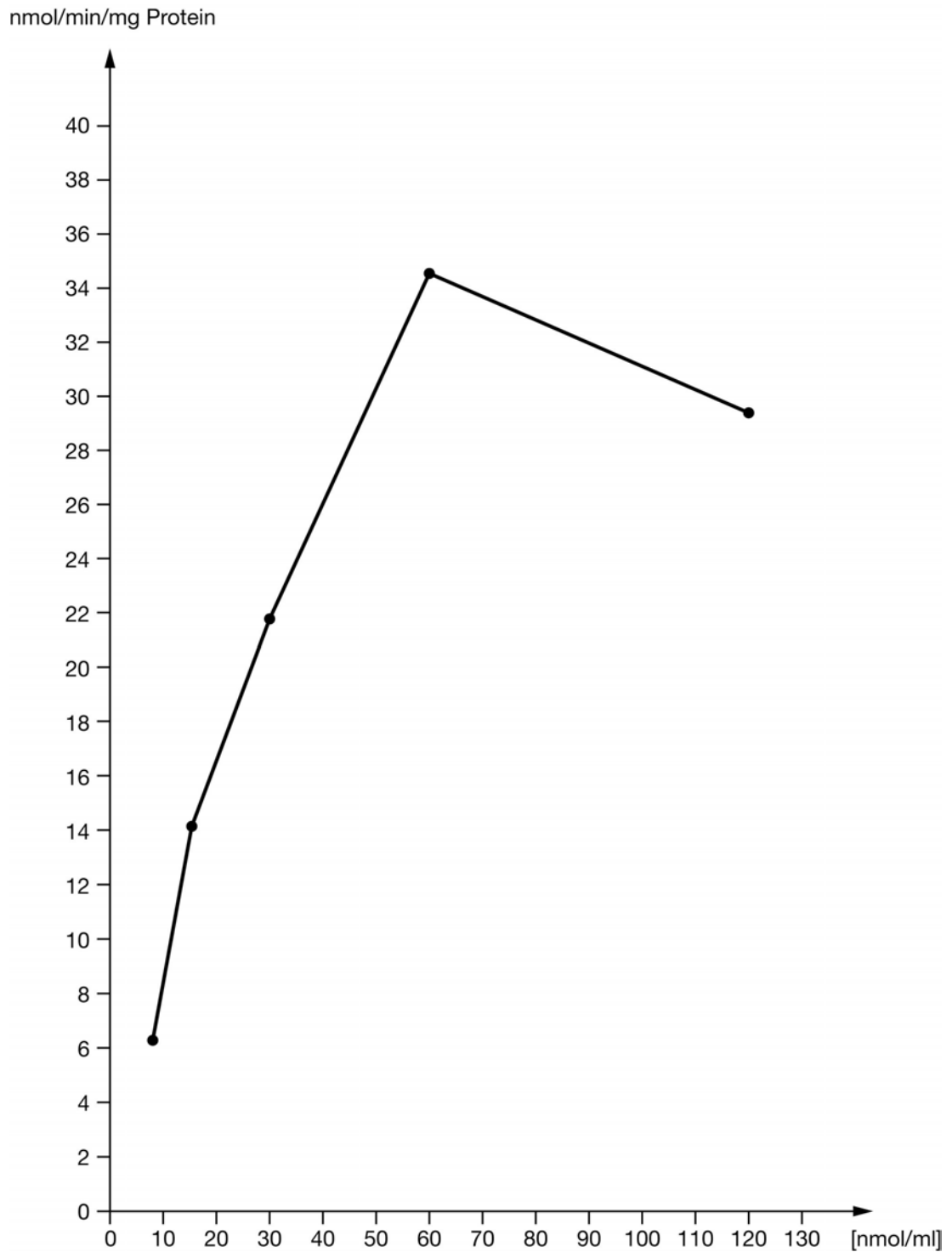


Abb. 7: Effekt der LPI-Konzentration auf die Aktivität der LAT.

Die enzymatische Aktivität wurde wie in Material und Methoden mit Arachidonyl-CoA (22 nmol/ml) als Substrat und bei verschiedenen Konzentrationen LPI als Lyso-Akzeptor bestimmt.

### **3.4. Acyl-CoA-Konzentrationsabhängigkeit der Acyltransferase.**

Ziel der Einbauversuche war es, die Aufnahme von gesättigten und ungesättigten Acyl-CoA-Verbindungen in verschiedene Lysoverbindungen zu charakterisieren und die Einbauraten der Lysoverbindungen (LPC, LPE und LPI) miteinander zu vergleichen.

#### **3.4.1. Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen in das LPC.**

Bei den Acyl-CoA-Verbindungen wurde das Arachidonyl-CoA, das Oleoyl-CoA und das Palmitoyl-CoA verwendet.

##### **3.4.1.1. Einbau von Arachidonyl-CoA in LPC.**

Die Acyltransferaseaktivität, die bereits in einigen radioaktiven Tests untersucht wurde (siehe Einleitung), wurde zunächst mit Arachidonyl-CoA gemessen. Die LPC-Konzentration betrug 50 nmol/ml und die Plasmamembran-Konzentration 40 µg Protein. Es wurden unterschiedliche Arachidonyl-CoA-Konzentrationen in einem Bereich von 2,5-30 nmol/ml verwendet.

Da die einzelnen Plasmamembranpräparationen sich in ihrer Enzymaktivität unterschieden, mußten Tests die verglichen werden sollten mit der gleichen Membranpräparation durchgeführt werden. Die Präparationen unterschieden sich dabei in dem Maximum der erreichten Einbaurate (nmol/min/mg Protein). Der Kurvenverlauf änderte sich nicht. Die Konzentrationsabhängigkeit von der Acyl-CoA-Verbindung war stets ähnlich. In den Abbildungen wird jeweils eine typische Präparation dargestellt (Abb. 8).

Die Konzentrationsabhängigkeit der Acyltransferasereaktion von der Arachidonyl-CoA-Verbindung zeigte eine MICHAELIS-MENTON-Kinetik (Abb. 9).

Das Optimum der Reaktion wurde mit 10 nmol/ml Arachidonyl-CoA erreicht.

Der  $K_M$ -Wert betrug 2,3 nmol/ml und die  $V_{max}$  19,8 nmol/mg Protein/min.

nmol/min/mg Protein

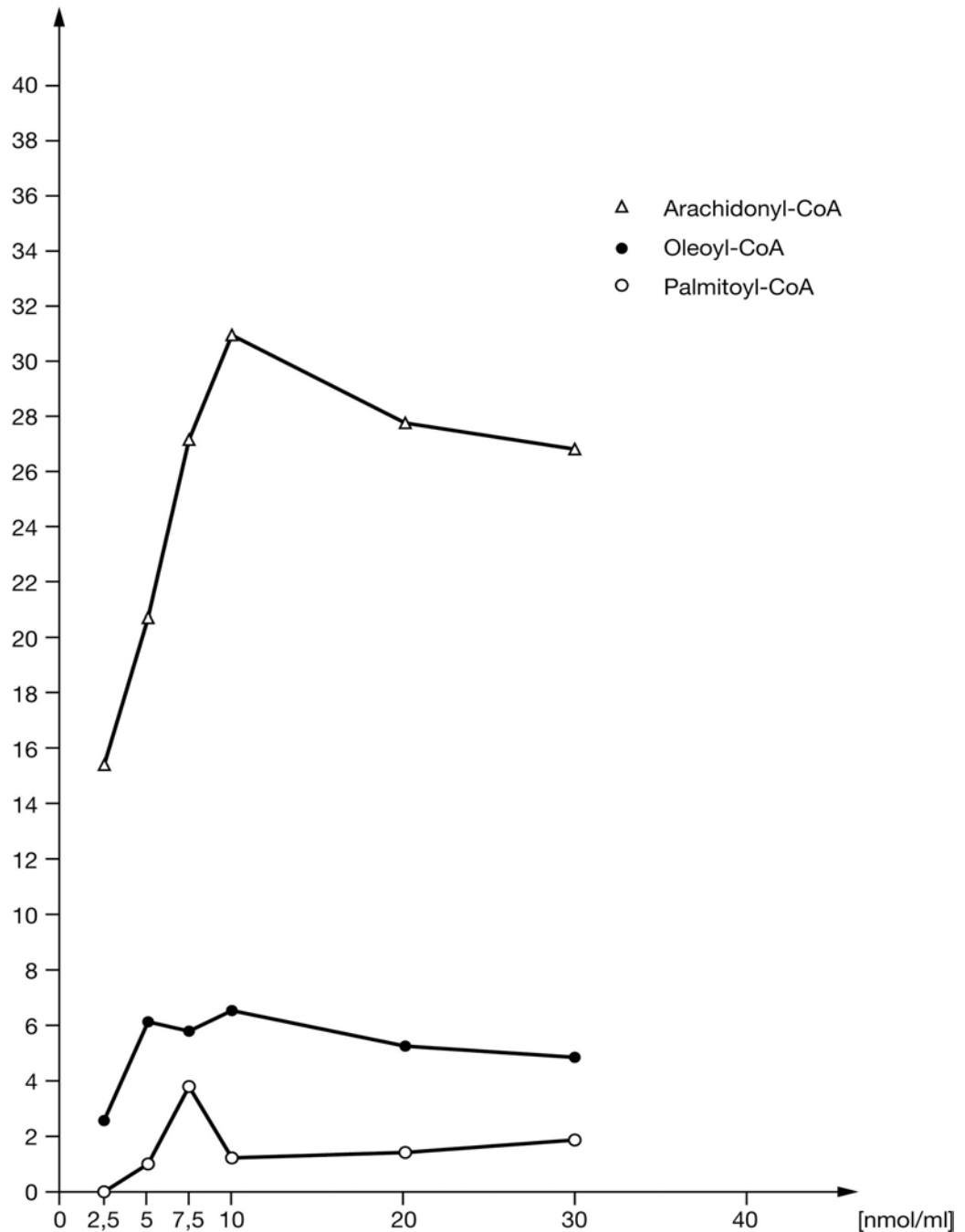


Abb. 8: Einbau von verschiedenen Acyl-CoA-Verbindungen in LPC durch die LAT  
Die Aktivität der LAT wurde wie in Material und Methoden beschrieben bei konstanter Konzentration des Lyso-Akzeptors LPC (50  $\mu$ M) und verschiedenen Konzentrationen von Acyl-CoA-Verbindungen bestimmt.

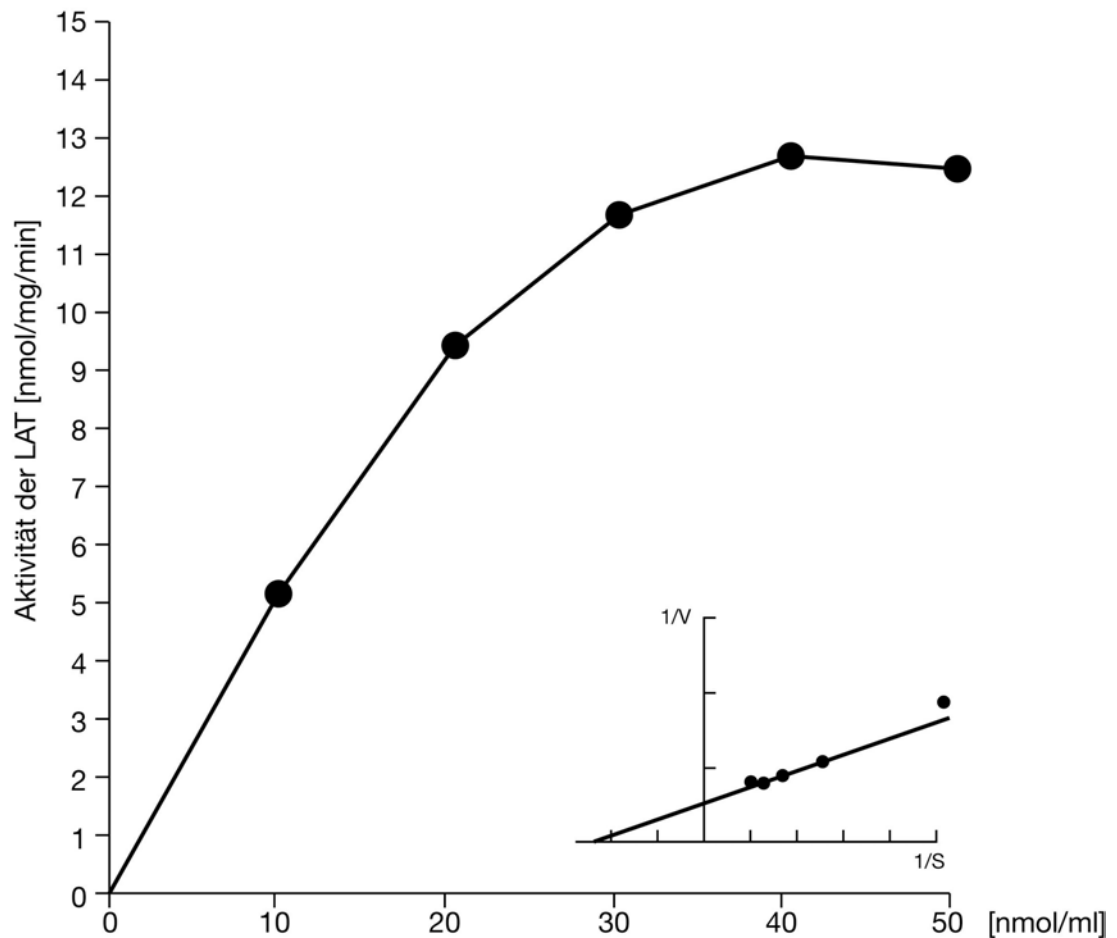


Abb. 9: Berechnung der Enzymaktivität der LAT bei Verwendung von Arachidonyl-CoA und LPC als Substrat

Die Enzymaktivität wurde wie in Material und Methoden beschrieben mit Arachidonyl-CoA und LPC bestimmt. Die  $K_M$  und  $V_{max}$  Werte wurden nach der MICHAELIS-MENTON Kinetik berechnet.

#### 3.4.1.2. Einbau von Oleoyl-CoA in LPC.

Der Einbau von Oleoyl-CoA nahm mit steigender Oleoyl-Konzentration zu (Abb. 8). Es zeigte sich eine andgedeutete Konzentrationsabhängigkeit, die meßtechnisch nicht zu erfassen war. Die Reaktion kam aber bei ungefähr 10-20 nmol/ml Oleoyl-CoA in ein Gleichgewicht. Oleoyl- und Arachidonyl-CoA verhielten sich prinzipiell ähnlich. Im Vergleich zu Arachidonyl-CoA war der Umsatz von Oleoyl-CoA jedoch deutlich geringer. Diese Untersuchungen

bestätigen die Auffassung, dass die LAT bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren umsetzt.

#### **3.4.1.3. Einbau von Palmitoyl-CoA in LPC.**

Der Einbau der gesättigten Palmitoyl-CoA-Verbindung in LPC war sehr gering. Palmitoyl-CoA war kein gutes Substrat für die Acetyltransferase. Der Einbau war kaum meßbar (Abb. 8). Nach der MICHAELIS-MENTON-Kinetik betrug der  $K_M$ -Wert 1,7  $\mu\text{M}$  und  $V_{\text{max}}$  4,6 nmol/mg Protein/min.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Acylierung von LPC am besten mit Arachidonyl-CoA durchführbar war. An zweiter Stelle folgte Oleoyl-CoA und als letztes Palmitoyl-CoA. Damit inkorporiert die Acyltransferase bevorzugt ungesättigte Fettsäuren im LPC.

#### **3.4.2. Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen in Lysophosphatidylethanolamin.**

Ähnlich wie für das LPC wurde die Einbaureaktion verschiedener Fettsäure-CoA-Verbindungen in das LPE charakterisiert (Abb. 10/11). Die Lysophosphatidylethanolamin-Konzentration betrug 200 und 300 nmol/ml und die Plasmamembran-Konzentration 80  $\mu\text{g}$ . Die Acyl-CoA-Konzentration lag in einem Bereich von 2,5-70 nmol/ml.



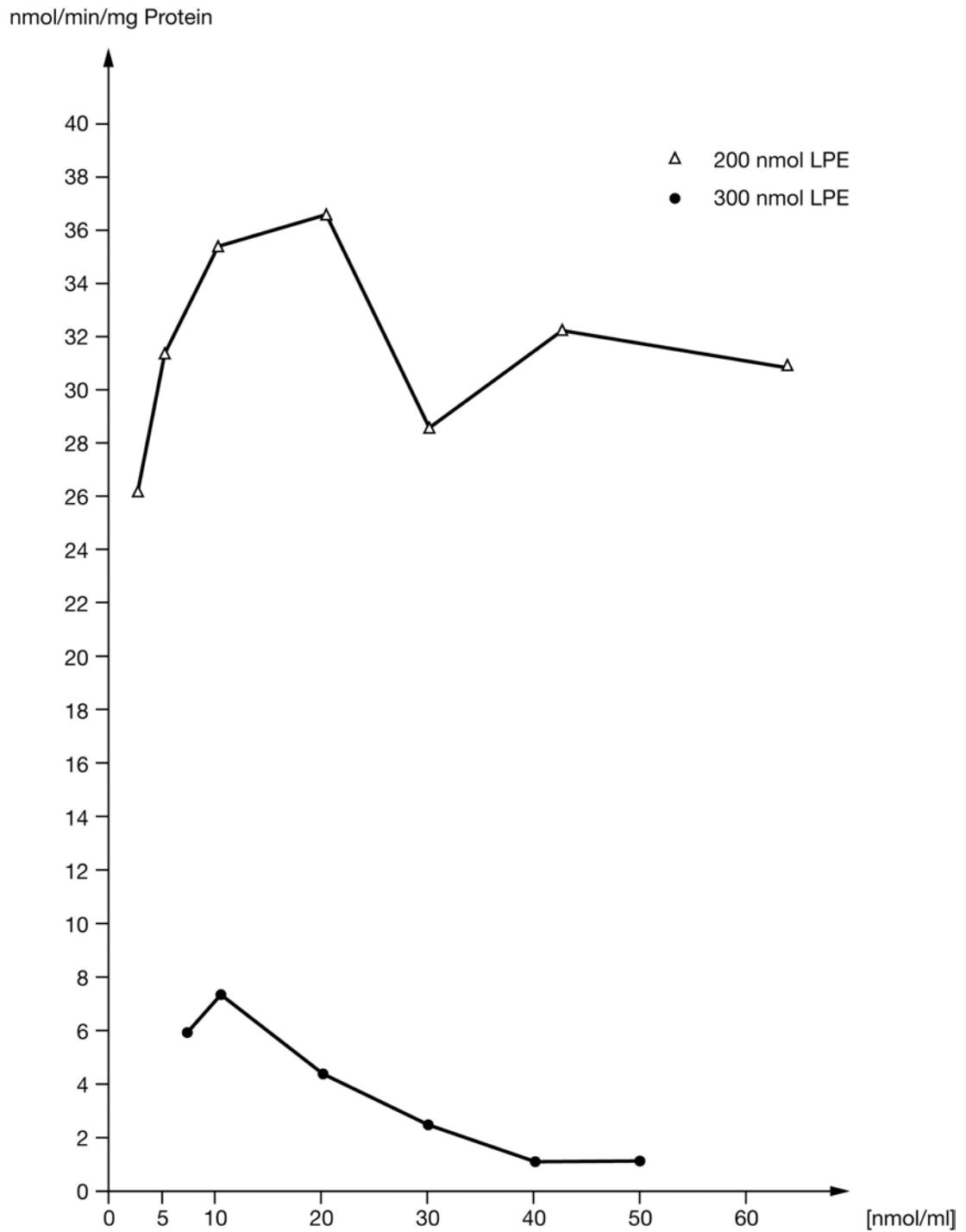


Abb. 10: Effekt der LPE-Konzentration auf die Aktivität der LAT.

Die enzymatische Aktivität wurde wie in Material und Methoden mit verschiedenen Konzentrationen von Arachidonyl-CoA als Substrat in Abhängigkeit von 2 Konzentrationen LPE als Lyso-Akzeptor bestimmt.

### 3.4.2.1. Einbau von Arachidonyl-CoA in LPE

Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Arachidonyl-CoA für den Einbau in LPE untersucht (Abb 11). Die Reaktion zeigte einen maximalen Einbau bei einer Arachidonyl-CoA-Konzentration von 10-20 nmol/ml.

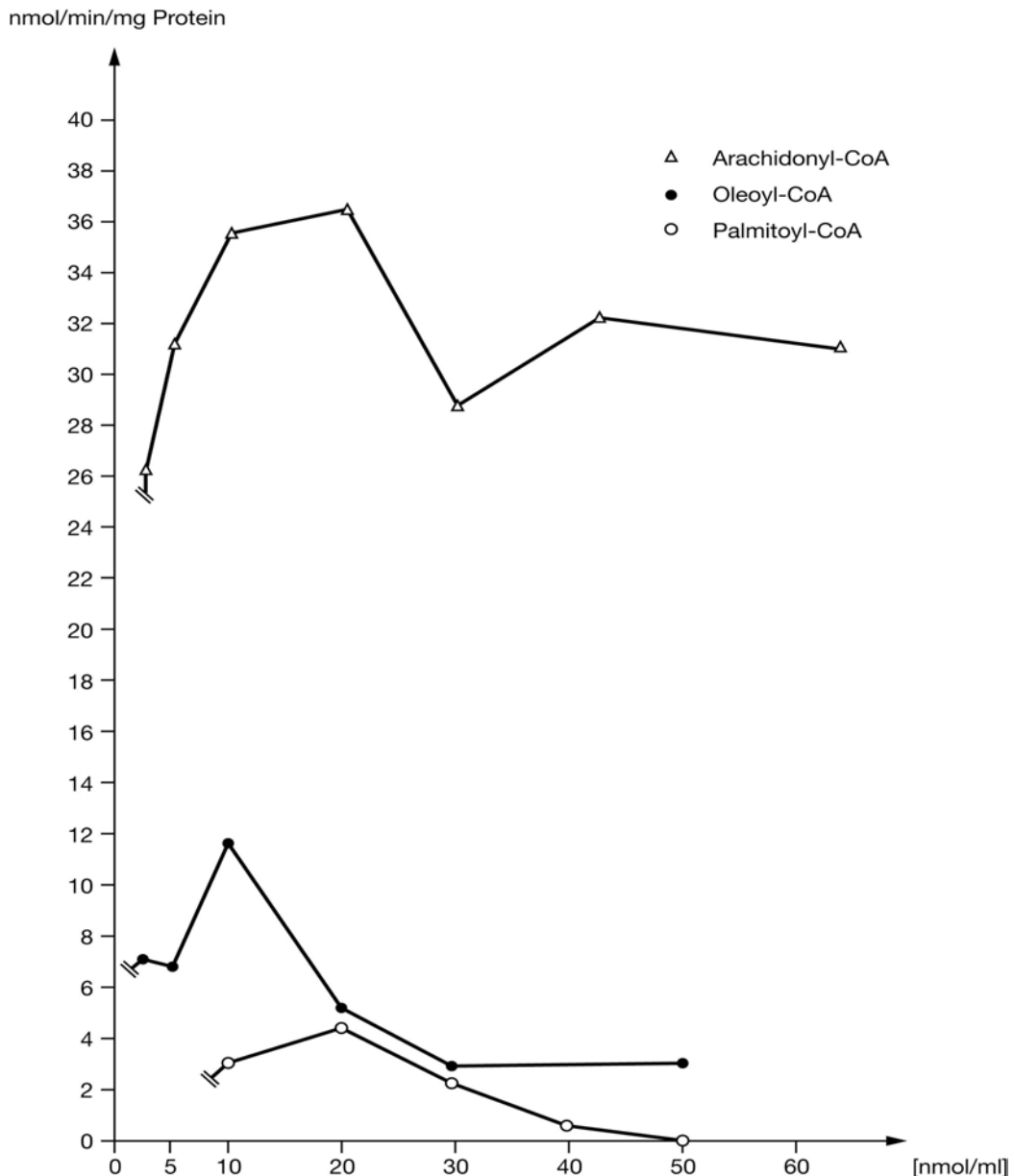


Abb. 11: Einbau von verschiedenen Acyl-CoA-Verbindungen in LPE durch die LAT  
Die Aktivität der LAT wurde wie in Material und Methoden beschrieben bei konstanter Konzentration des Lyso-Akzeptors LPE (200  $\mu$ M) und verschiedenen Konzentrationen von Acyl-CoA-Verbindungen bestimmt.

#### **3.4.2.2. Einbau von Oleoyl-CoA in LPE.**

Im zweiten Ansatz wurde an Stelle von Arachidonyl-CoA Oleoyl-CoA verwendet (Abb. 11). Die Acyltransferase zeigte einen guten Umsatz mit 10 nmol/ml Oleoyl-CoA. In höheren Substratkonzentrationen trat eine Abnahme des Einbaus ein. Der Kurvenverlauf beider Substrate, Arachidonyl-CoA und Oleoyl-CoA, war sehr ähnlich. Im Vergleich zwischen beiden Verbindungen wurde insgesamt mehr Arachidonyl-CoA eingebaut. Dies zeigt sich an den deutlich höheren Umsatzraten.

#### **3.4.2.3. Einbau von Palmitoyl-CoA in LPE.**

Der Einbau der gesättigten Palmitoyl-CoA-Verbindungen in die C<sub>2</sub>-Position des LPE war niedrig und zeigte ein Maximum bei 20 nmol/ml (Abb. 11). Im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten mit den ungesättigten Acyl-CoA-Verbindungen handelt es sich bei dieser Verbindung um das schlechteste Substrat.

Zusammenfassend gilt auch für das LPE, dass die Acyltransferase ungesättigte Acyl-CoA-Verbindungen mit deutlicher Präferenz in das LPE einbaut.

#### **3.4.3. Einbau von Acyl-CoA-Verbindungen in Lysophosphatidylinositol.**

Lysophosphatidylinositol stand zu Beginn der Experimente kommerziell nicht zur Verfügung. Die Synthese der Substanz in ausreichender Menge gestaltete sich sehr schwierig (siehe Kapitel 2.2.1 und 3.1). Die Analyse des Fettsäureinbaus in das LPI wurde durch die kommerzielle Verfügbarkeit erleichtert.

#### **3.4.3.1. Einbau von Arachidonyl-CoA in LPI.**

Die Abhängigkeit der Acyltransferase von der Arachidonyl-CoA-Konzentration zeigte ähnlich der LPE-Reaktion ein Peakverhalten im Bereich der niedrigen Arachidonyl-CoA-Konzentration (Abb. 12). Bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen wurde die Sättigung erreicht. Bei höheren Konzentrationen kam es zur Inhibition der Enzymreaktion und die Einbaurrate fiel bei 5-10 mM Arachidonyl-CoA ab.

Mit diesem optischen Verfahren ließ sich aufgrund der Meßtechnik in dem unteren Konzentrationsbereich (unter 5 nmol/ml) keine Einbaurrate messen. Der errechnete  $K_M$ -Wert betrug 1,7 nmol/ml und  $V_{max}$  11,8 nmol/mg Protein/min.

#### **3.4.3.2. Einbau von Oleoyl-CoA in LPI.**

In dem gemessenen Konzentrationsbereich von 5-50 nmol/ml Oleoyl-CoA waren die Einbauraten fast konstant und zeigten nur eine geringe Abnahme im Bereich von 50 nmol/ml Oleoyl-CoA (Abb. 12).

Die Reaktion liegt anscheinend schon im Sättigungsbereich. Der Versuch, in den unteren Konzentrationen zu messen, zeigte keine Extinktionsänderung. Mit dem optischen Test war diese Messung nicht möglich. Eine Versuchsreihe mit radioaktiv markiertem Oleoyl-CoA bestätigte die optisch gemessenen Werte. Der Einbau von Oleoyl-CoA im LPI erreicht sehr schnell die Sättigung.

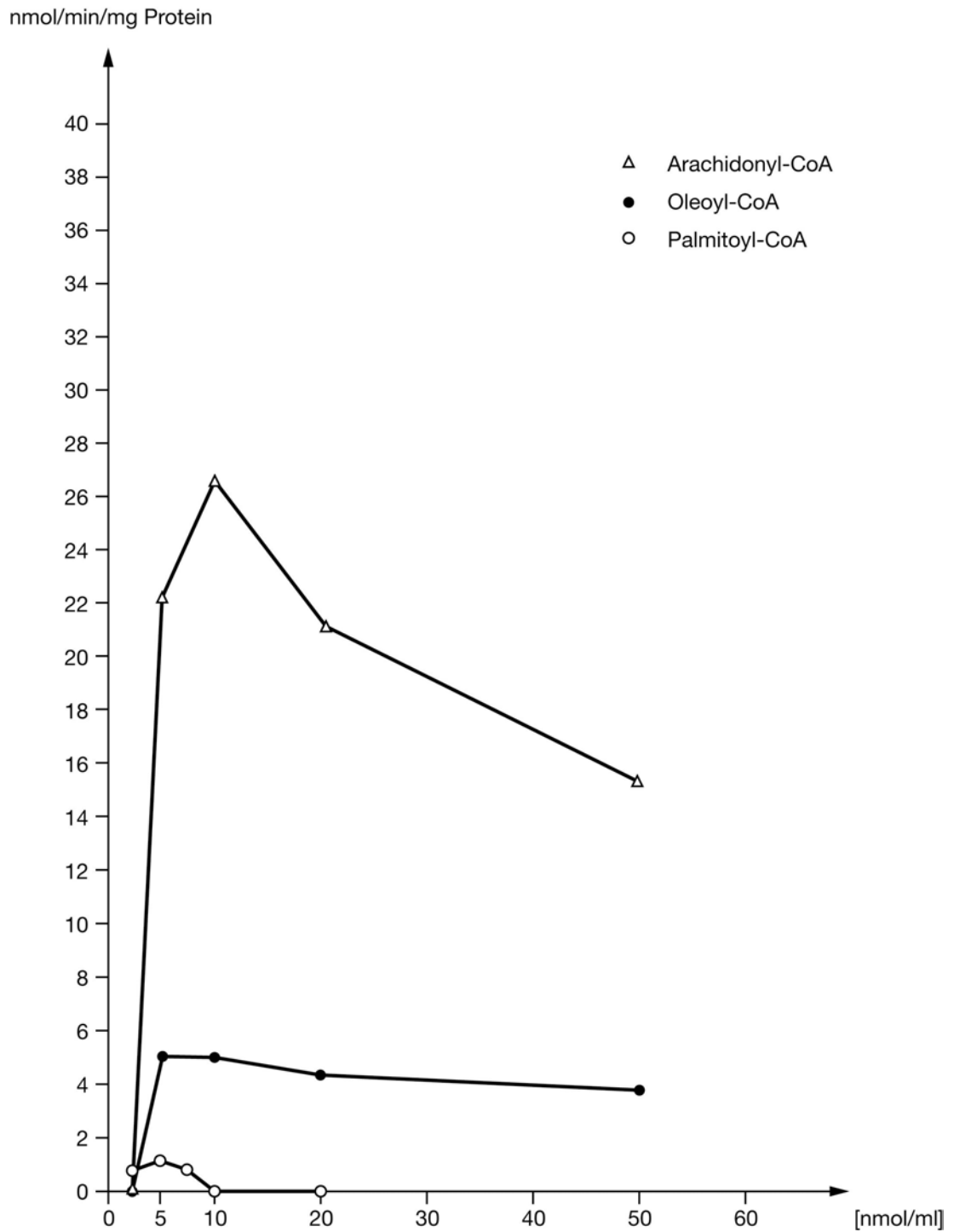


Abb. 12: Einbau von verschiedenen Acyl-CoA-Verbindungen in LPI durch die LAT

Die Aktivität der LAT wurde wie in Material und Methoden beschrieben bei konstanter Konzentration des Lyso-Akzeptors LPI und verschiedenen Konzentrationen von Acyl-CoA-Verbindungen bestimmt.

### 3.4.3.3. Einbau von Palmitoyl-CoA in LPI.

Die gesättigte Palmitoyl-CoA-Verbindung war das schlechteste Substrat für die Acyltransferase (Abb. 12). Ein geringerer Einbau war im Bereich von 5-7,5 nmol/ml Palmitoyl-CoA-Konzentration zu messen. Bei Konzentrationen über 10 nmol/ml war keine Extinktionsänderung meßbar, es wurde kein Substrat eingebaut.

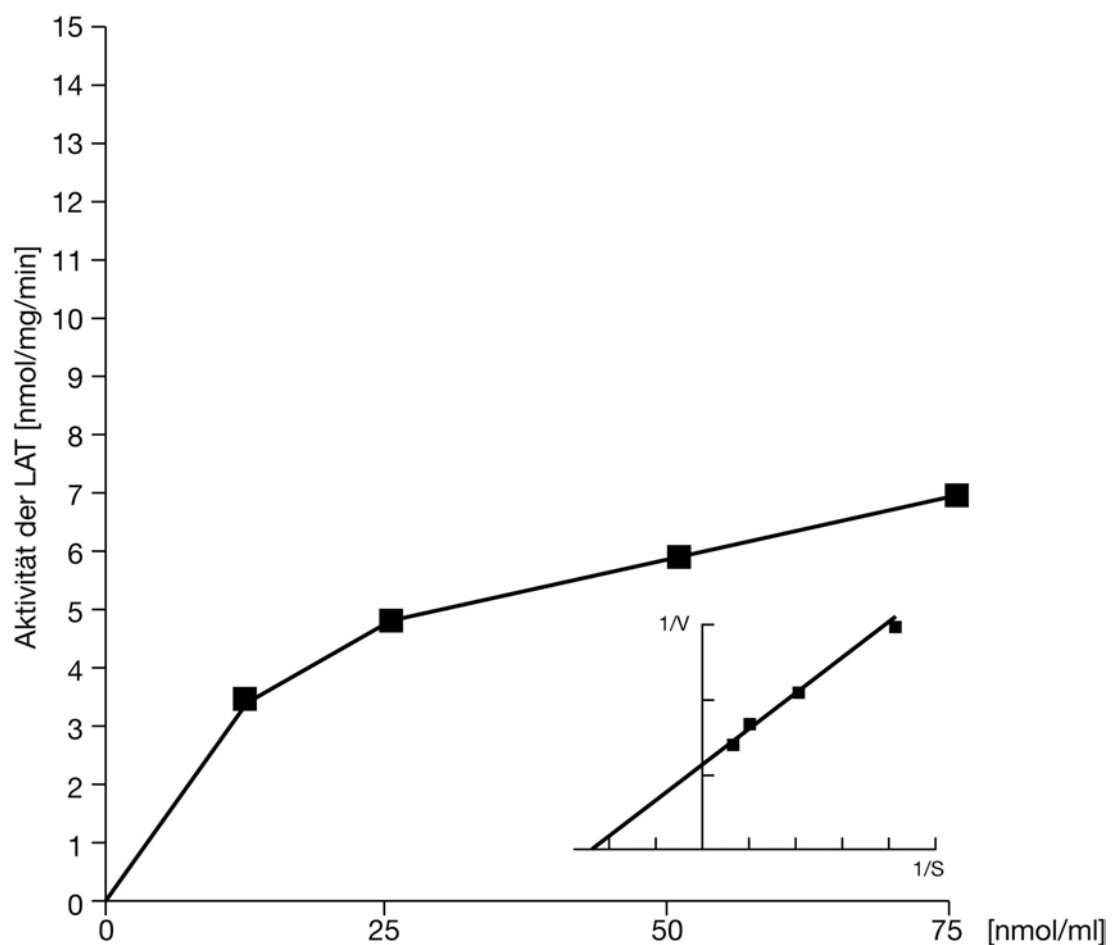


Abb. 13: Berechnung der Enzymaktivität der LAT bei Verwendung von Arachidonyl-CoA und LPI als Substrat

Die Enzymaktivität wurde wie in Material und Methoden beschrieben mit Arachidonyl-CoA und LPI bestimmt. Die  $K_M$  und  $V_{max}$  Werte wurden nach der MICHAELIS-MENTON Kinetik berechnet.

### **3.5. Hemmung des Acyl-CoA-Einbaus in LPC durch verschiedene Fettsäuren.**

Der Einbau von aktivierten Fettsäuren in LPC zeigte eine Abhängigkeit von der Anzahl ihrer Doppelbindungen. Eine größere Einbaurrate wurde mit der mehrfach ungesättigten Arachidonyl-CoA-Verbindung erreicht. Es stellte sich die Frage, ob freie Fettsäuren den Einbau beeinflussen könnten. Damit wird die Frage verbunden, ob freie Fettsäuren an die Acyltransferase binden und Acyl-CoA-Verbindungen nicht mehr umgesetzt werden können.

Die folgenden Untersuchungen wurden mit LPC in einer Konzentration von 50 nmol/ml und 3 unterschiedlichen CoA-Verbindungen durchgeführt. Die Plasmakonzentration betrug 40 µg. Als freie Fettsäuren dienten Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure.

#### **3.5.1. Einbau von Arachidonyl-CoA.**

Zunächst wurde die ungehemmte Acyltransferase-Reaktion gemessen. Dazu wurde die Plasmamembran unter optimalen Bedingungen mit LPC (50 nmol/ml) und Arachidonyl-CoA (22 nmol/ml) inkubiert. Das Ergebnis (nmol/min/mg Protein) dieser Reaktion wurde als Ausgangswert für die folgenden Versuche auf die Ordinate aufgetragen (Abb. 14). Dann wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen einer Fettsäure zugesetzt.

Die Acyltransferase wurde durch die Konkurrenz zwischen freier Fettsäure und der Acyl-CoA-Verbindung beeinflusst. Der Einbau der Acyl-CoA-Verbindung in LPC nahm abhängig von der verwendeten Fettsäure ab.

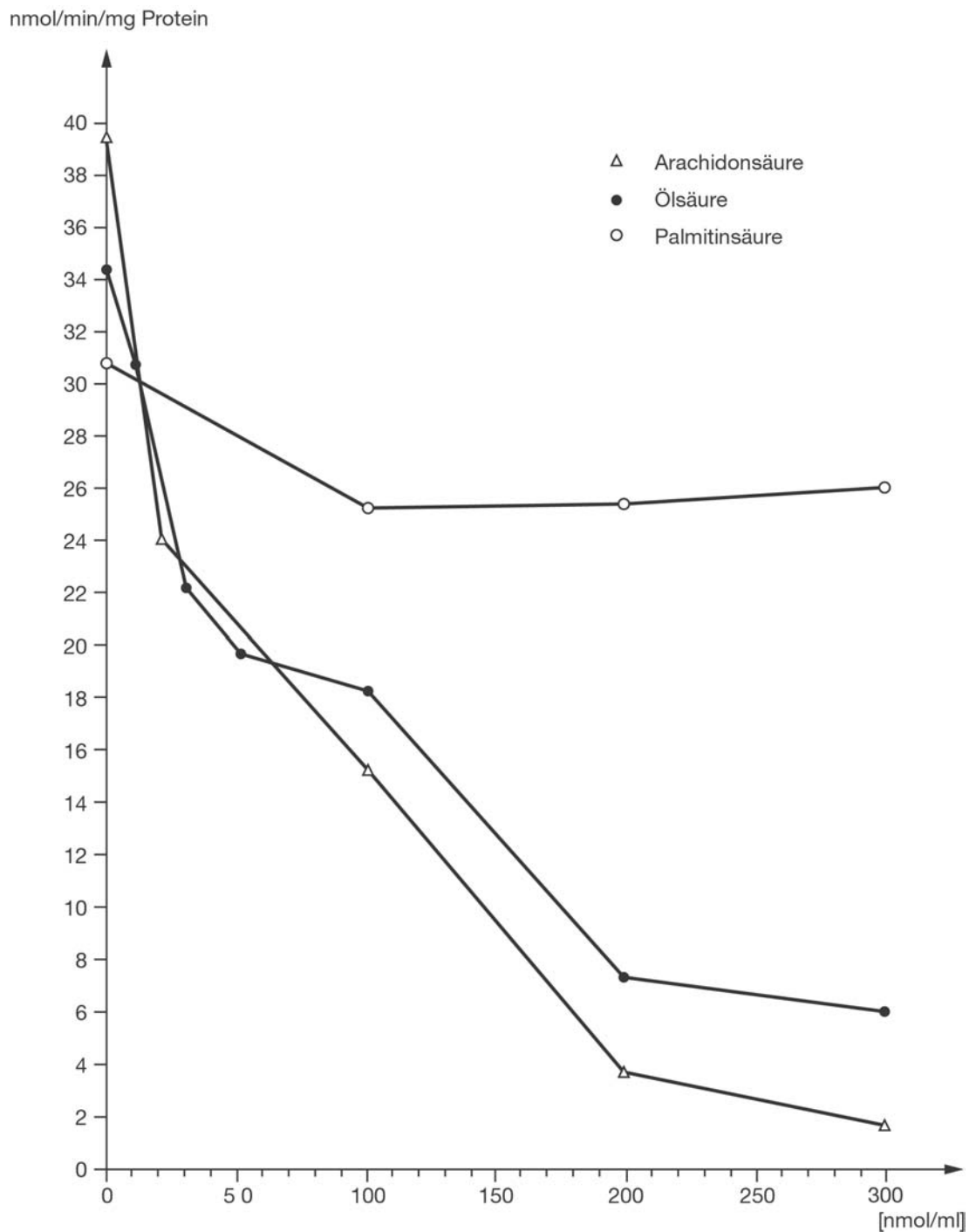


Abb. 14: Hemmung des Einbaus von Arachidonyl-CoA-Verbindungen in LPC durch Fettsäuren

Die Aktivität der LAT wurde wie in Material und Methoden beschrieben bei konstanter Konzentration des Lyso-Akzeptors LPC und der Arachidonyl-CoA-Verbindungen unter Einfluss verschiedener freier Fettsäuren bestimmt.



Als erstes wurde die mehrfach ungesättigte Arachidonsäure (20:4) zugesetzt. Mit steigender Konzentration der Arachidonsäure sank der Einbau der Arachidonyl-CoA-Verbindung (Abb. 14). Bei einer Arachidonsäure-Konzentration von 300 nmol/ml war nur ein geringer Einbau von Arachidonyl-CoA meßbar.

Als zweite Fettsäure wurde die Ölsäure (18:2) eingesetzt. Auch diese Fettsäure hemmte mit zunehmender Konzentration den Arachidonyl-CoA-Umsatz. Allerdings war der Effekt nicht so ausgeprägt wie bei der Arachidonsäure (Abb. 14).

Als dritte Fettsäure wurde Palmitinsäure (16:0) in steigenden Konzentrationen verwendet. Diese Fettsäure beeinflusste im verwendeten Konzentrationsbereich den Einbau von Arachidonyl-CoA in LPC nur sehr gering.

### **3.5.2. Einbau von Oleoyl-CoA.**

Zunächst wurde auch hier die unbeeinflusste Acyltransferase-Reaktion mit der einfach ungesättigten Oleoyl-CoA-Verbindung in einer Konzentration von 20 nmol/ml gemessen. Die Reaktion hatte wie in den vorangegangenen Experimenten im Vergleich zu Arachidonyl-CoA-Umsatz eine geringere Einbaurrate.

Die Einbaurrate konnte durch die Zugabe von Arachidonsäure und Ölsäure gehemmt werden (Abb. 15). Bei sehr hohen Arachidon- und Ölsäure-Konzentrationen (30 nmol/ml) war kein Umsatz von Oleoyl-CoA mehr meßbar.

Die Zugabe von Palmitinsäure hatte erst bei 300 nmol/ml einen geringen Einfluss. Bei niedrigeren Konzentrationen blieb die Acyltransferasereaktion unbeeinflusst.

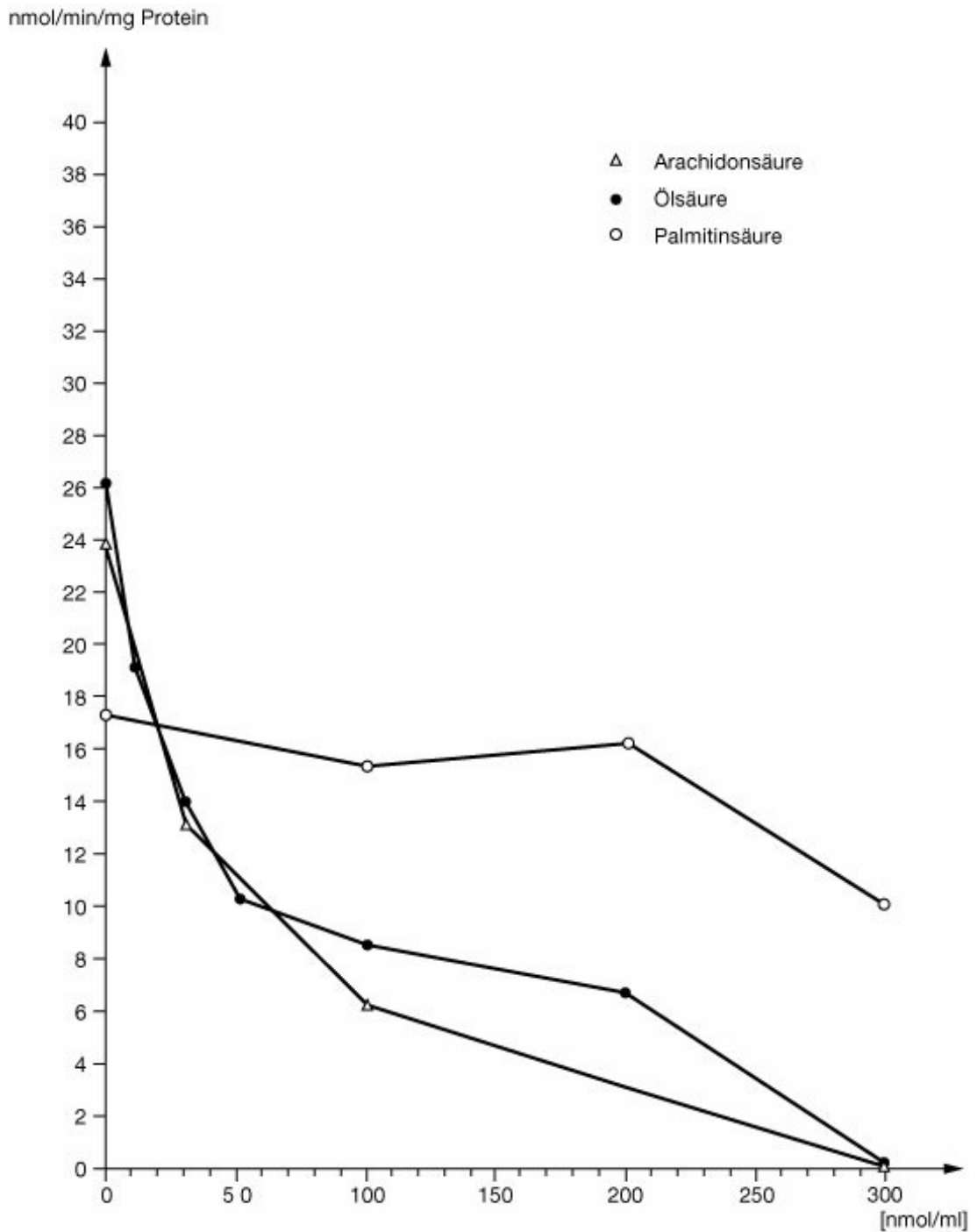


Abb. 15: Hemmung des Einbaus der Oleoyl-CoA-Verbindung in LPC durch Fettsäuren

Die Aktivität der LAT wurde wie in Material und Methoden beschrieben bei konstanter Konzentration des Lyso-Akzeptors LPC und der Oleoyl-CoA-Verbindungen unter Einfluss verschiedener freier Fettsäuren bestimmt.

Demnach ist auch der Einbau von Oleoyl-CoA in LPC durch die Zugabe von Fettsäuren beeinflussbar. Der Einbau konnte sogar völlig gehemmt werden, wenn mehrfach ungesättigte Fettsäuren in hohen Konzentrationen zugesetzt wurden.

Im Vergleich zum Arachidonyl-CoA-Einbau ist der Oleoyl-CoA-Einbau stärker zu beeinflussen. Schon die Ausgangsreaktion zeigt bei Oleoyl-CoA einen niedrigeren Umsatz (26 nmol/min/mg Protein) als bei der Arachidonyl-CoA-Reaktion (ungefähr 35 nmol/min/mg Protein). Die mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure inhibiert den Oleoyl-CoA-Einbau stärker als den Arachidonyl-CoA-Einbau. Bei 300 nmol/ml Arachidonsäure ist der Oleoyl-CoA-Einbau vollständig gehemmt, während der Arachidonyl-CoA-Einbau noch 2 nmol/min/mg Protein beträgt.

Dies bestätigt die Ergebnisse der Einbauexperimente, dass die Acyltransferase bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren umsetzt.

### **3.5.3. Einbau von Palmitoyl-CoA.**

Die gesättigte Palmitoyl-CoA-Verbindung zeigte die niedrigsten Einbauraten. Eine komplette Hemmung des Einbaus des Palmitoyl-CoA in das LPC wurde schon mit geringen Arachidonsäure-Konzentrationen (10 nmol/ml) erreicht (Abb. 16). Ebenfalls zeigte die Ölsäure ab 20 nmol/ml eine komplette Inhibition des Palmitoyl-CoA-Einbaus.

Der Zusatz von Palmitinsäure zeigte keinen Einfluss. Durch die geringen Extinktionsänderungen war die Auswertung der Palmitoyl-CoA-Reaktion eingeschränkt. Eine eindeutige Reduktion der Einbauraten konnte durch Fettsäurezusatz jedoch beobachtet werden.

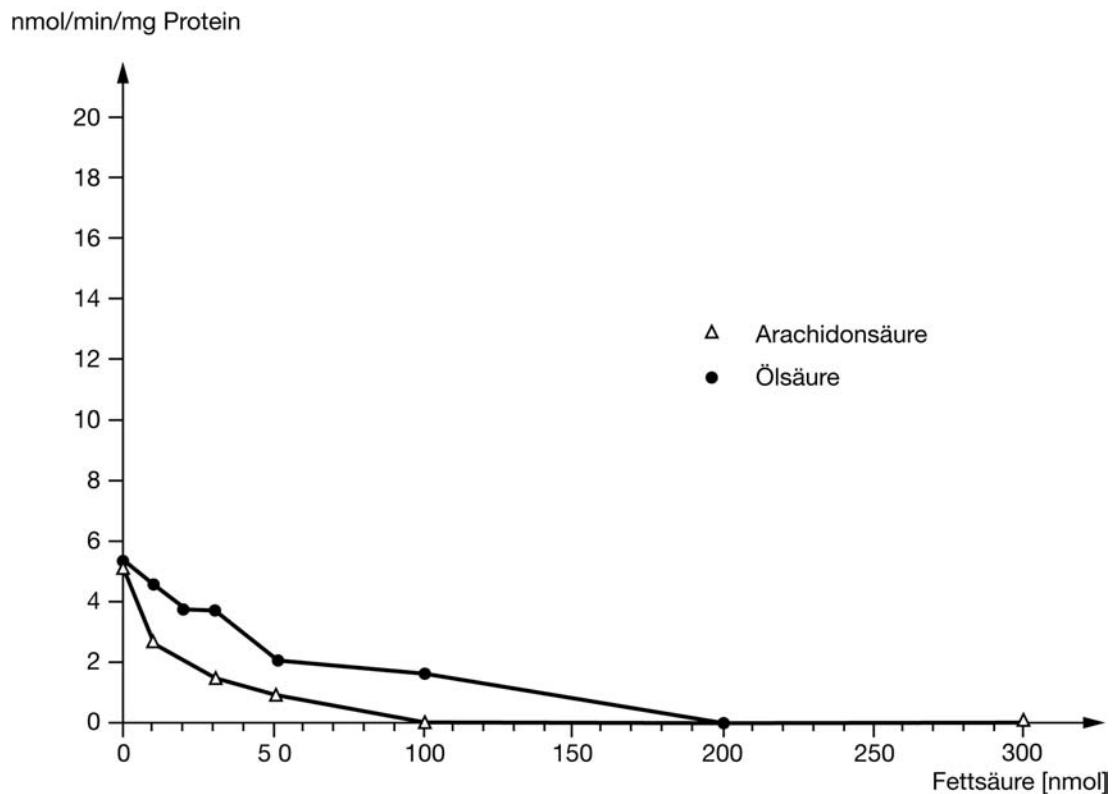


Abb. 16: Hemmung des Einbaus der Palmitoyl-CoA-Verbindung in LPC durch Fettsäuren

Die Aktivität der LAT wurde wie in Material und Methoden beschrieben bei konstanter Konzentration des Lyso-Akzeptors LPC und der Palmitoyl-CoA-Verbindungen unter Einfluss verschiedener freier Fettsäuren bestimmt.

Die gesättigte Palmitoyl-CoA-Verbindung ist nach den gezeigten Ergebnissen das schlechteste Substrat für die Acyltransferase und wird durch ungesättigte Fettsäuren von der Acyltransferase verdrängt.

### 3.6. Aktivität der LAT in Plasmamembranen von mitogen stimulierten T-Lymphozyten.

Zur Frage, ob sich die Enzymaktivität während der Aktivierung der T-Lymphozyten ändert, wurden T-Lymphozyten mit Concanavalin A für 30 und 120 Minuten stimuliert. Plasmamembranen von Kontrollzellen sowie den Conca-

navalin A-stimulierten Zellen wurden aufgereinigt und die enzymatische Aktivität der LAT bestimmt. Als Substrate wurden Arachidonyl-CoA/1-Acyl-GPC, Arachidonyl-CoA/1-Acyl-GPI sowie Palmitoyl-CoA/1-Acyl-GPC verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Aktivität der LAT in Plasmamembranen von Mitogen stimulierten T-Lymphozyten

Zeit der Mitogen Stimulation	30 Minuten		120 Minuten	
	Kontrolle	Con A	Kontrolle	Con A
Arachidonyl-CoA/1-Acyl-GPC	15,2 ± 1,3	24,6 ± 2,6	15,9 ± 1,4	30,5 ± 1,1
Arachidonyl-CoA/1-Acyl-GPI	10,4 ± 0,4	17,1 ± 1,6	7,2 ± 1,2	13,5 ± 1,8
Palmitoyl-CoA/1-Acyl-GPC	2,8 ± 0,6	4,4 ± 0,4	2,7 ± 0,3	4,3 ± 0,3

T-Lymphozyten wurden mit Concanavalin A (Con A) für 30 oder 120 Minuten stimuliert. Plasmamembranen wurden von den Zellen isoliert und die enzymatische Aktivität der LAT mittels der aufgeführten Substrate bestimmt. Die Enzymaktivität ist als nmol/mg Protein/min angegeben. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von 5 Präparationen für 30 Minuten Stimulation und von 2 Präparationen für 120 Minuten Stimulation.

Die Messungen ergaben, dass durch die Mitogenaktivierung der T-Lymphozyten die Enzymaktivität durch die Aktivierung um 60-70% gesteigert wurde. Die erhöhte Aktivität wurde durch einen Anstieg in den  $V_{max}$ -Werten verursacht, während die  $K_M$ -Werte im Wesentlichen unverändert blieben. Die beobachtete präferenzielle Inkorporation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in aktivierten T-Lymphozyten ist deshalb durch einen Anstieg in

der Reaktionsgeschwindigkeit und nicht durch Änderung der Affinität des aktivierten Enzyms bezüglich der verschiedenen Substrate begründet.

## 4. Diskussion

Veränderungen des Lipidmetabolismus spielen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass während der mitogeninduzierten Aktivierung von Kaninchen-T-Lymphozyten vermehrt ungesättigte Fettsäuren, vor allem die 4-fach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure in die Phospholipide inkorporiert werden (GOPPELT-STRÜBE et al., 1985). Da ungesättigte Fettsäuren während der de novo-Synthese nicht in Phospholipide eingebaut werden, können ungesättigte Fettsäuren nur während einer Deacylierung/Reacylierung-Reaktion in Phospholipide integriert werden (HILL et al., 1968). Schlüsselenzyme des Reacylierungsprozesses sind die Acyltransferasen. Die Lysophosphatid Acyltransferase (LAT) ist im endoplasmatischen Retikulum der meisten Zelltypen detektierbar (EIBEL et al., 1969; MAGARAL et al., 1978). Allerdings findet sich die höchste Enzymaktivität in T-Lymphozyten (FERBER et al., 1973). Die Acyl-CoA-Spezifität der 1-Acyl-GPC-Acyltransferase von T-Zellen entsprach der in anderen Zellen (FERBER et al., 1973). Andere Lysoakzeptoren waren bisher jedoch nicht untersucht worden.

Ziel der Doktorarbeit war die Charakterisierung der LAT in Lymphozyten.

Die LAT katalysiert die Acylierung von Lysophospholipiden mit aktivierten Fettsäuren. Es gibt zwei Möglichkeiten diese Reaktion in vitro zu messen. Die erste Methode misst die Menge von Phospholipiden, die aus radioaktiv markierten Vorläufern, entweder Acyl-CoA oder Lysophospholipid, synthetisiert werden. Alternativ kann die Freisetzung des Co-Enzym A optisch gemessen werden, indem der Farbstoff DTNB verwendet wird. Obwohl der optische Test weniger sensitiv ist als der radioaktive, bietet er

einige Vorteile. Der optische Test ist unabhängig von der Verfügbarkeit des radioaktiv markierten Substrats und erlaubt die Beobachtung der Reaktion über die gesamte Inkubationszeit. Dies ist vor allem wichtig wenn niedrige Substratkonzentrationen verwendet werden, da die Reaktion in diesem Bereich nur für einige Minuten linear ist.

Die Lysophosphatidacyltransferase ist sensitiv gegenüber Sulfhydryl-Reagenzien wie z.B. Thimerosal (FÖRSTERMANN et al., 1986). Die Enzymaktivität der LAT von Kalbsthymozyten wurde komplett durch 10  $\mu\text{mol}$  Thimerosal inhibiert. DTNB kann ebenfalls mit der für die Enzymreaktion essenziellen Sulfhydrylgruppe der LAT reagieren. Allerdings entwickelt sich diese Inhibition sehr langsam und die enzymatische Aktivität war nicht signifikant während der ersten 10 Minuten verändert und wurde um 5-10% nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C reduziert. Um den Einfluss der farbstoffabhängigen Inaktivierungsreaktion zu minimalisieren, wurden die Plasmamembranen jeweils 5 Minuten vor der eigentlichen Enzymreaktion mit dem Farbstoff inkubiert und diese initiale Reaktion wurde während der ersten 3 Minuten beobachtet.

Acylierung von 1-Acyl-Phosphatidylcholin (LPC) und 1-Acyl-Phosphatidylinositol (LPI): Mit Arachidonyl-Co-Enzym A als Substrat folgte die Reaktion in Hinblick auf die Lysoakzeptoren LPC und LPI der Michael-Menton-Kinetik. Die  $K_M$ -Werte wurden durch eine computerunterstützte Least-square-Analyse bestimmt und betragen im Mittel 2,1 bis 2,2 nmol/ml. Die  $K_M$ -Werte variierten abhängig von der Präparation zwischen 1,5 und 5,0 nmol/ml. In den meisten gemessenen Präparationen lag der  $K_M$ -Wert für LPI etwas niedriger als der für LPC. Ähnliche Werte wurden ebenfalls in



Mikrosomen des Mäusegehirns (WISE et al., 1980) und humanen Thrombozyten (McKEAN et al., 1982) mit Oleoyl-CoA und Arachidonyl-CoA als Substrat bestimmt.

Während nur leichte Unterschiede in den  $K_M$ -Werten mit unterschiedlichen Lysoakzeptoren nachweisbar waren, unterschied sich der  $V_{max}$ -Wert erheblich zwischen den beiden Lysoakzeptoren. Der  $V_{max}$ -Wert betrug 11 nmol/mg Protein/min für LPC und 19 nmol/mg Protein/min für LPI. Diese Differenz wurde in Plasmamembranen von unstimulierten als auch mitogen stimulierten T-Lymphozyten beobachtet.

Fettsäurespezifität der Lysophosphatidacyltransferase: Arachidonyl-CoA wurde sowohl in LPC als auch in LPI inkorporiert. Im Gegensatz dazu wurde die gesättigte Fettsäure Palmitoyl-CoA in LPC, aber nicht in LPI transferiert. Unter Verwendung von LPI als Lysoakzeptor war die Acetylierungsreaktion des Palmitoyl-CoA unterhalb der Nachweisgrenze. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Daten, die eine schlechte Inkorporation von exogener Palmitinsäure in Phosphatidylinositol von Lymphozyten zeigen (RODE et al., 1982).

Durch die limitierte Sensitivität des Assays waren die  $K_M$ -Werte für Palmitoyl-CoA schwierig zu bestimmen. Allerdings sollte der Formalismus der Michaelis-Menton-Kinetik mit Vorsicht betrachtet werden, da weder das Enzym noch das Substrat wasserlöslich sind. Langkettige Acyl-CoA-Derivate formen molekulare Lösungen nur bei niedrigen Konzentrationen und Mizellen bei höheren Konzentrationen. Die kritische Konzentration für die Bildung von Mizellen ist abhängig von dem Fettsäureanteil als auch vom Puffersystem (SMITH & POWELL, 1986; CONSTANTINIDES & STEIM; 1985). Weiterhin

binden die Acyl-CoA-Verbindungen an Proteine (BARTLEZZ et al., 1985) und diffus an Membranen (SUMPER & TRÄUBLE, 1973). Deshalb ist die Konzentration des Substrats, das für das Enzym erreichbar ist, nicht notwendigerweise identisch mit der gegebenen Konzentration. Weiterhin kann die Lysoverbindung LPC oder LPI das Milieu des Systems durch partielle Solubilisierung der Plasmamembranen verändern. Dies verändert die Enzymaktivität nicht signifikant, da diese bis zu einer Konzentration von 200 nmol/ml beider Lysoakzeptoren konstant blieb.

Effekt von freien Fettsäuren auf die Aktivität der LAT: Mit zunehmender Konzentration des Acyl-CoA erreicht die enzymatische Reaktion ein Optimum und nimmt bei höherer Konzentration des Acyl-CoA ab. Eine ähnliche Kinetik wurde von Miki et al. (MIKI et al., 1977) mit Rattenlebermikrosomen demonstriert. Die Inhibition beruht wahrscheinlich auf einer Substratinhibition. Deshalb wurden die Effekte von Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure auf die Acylierungsreaktion von Arachidonyl-CoA, Oleoyl-CoA und Palmitoyl-CoA zu LPC bestimmt.

Zunächst wurden Arachidonyl-CoA als Substrat verwendet und der Einfluss auf die Acylierungsreaktion durch die Fettsäuren Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure untersucht. Alle 3 Fettsäuren hemmten die Enzymreaktion in einer konzentrationsabhängigen Weise. Mit steigender Konzentration der Arachidonsäure sank der Einbau der Arachidonyl-CoA-Verbindung. Bei einer Arachidonsäure-Konzentration von 40 nmol/ml war nur noch ein geringer Einbau von Arachidonyl-CoA messbar. Ein ähnlicher Effekt war unter Verwendung von Ölsäure zu verzeichnen. Der Effekt war allerdings nicht so ausgeprägt wie bei Arachidonsäure. Die gesättigte Fettsäure Palmitinsäure

hatte auch bei steigenden Konzentrationen keinen wesentlichen Einfluss auf den Einbau von Arachidonyl-CoA in LPC.

Bei Verwendung von Oleoyl-CoA als Substrat konnte dessen Umsatz durch die LAT durch die freien Fettsäuren ebenfalls modifiziert werden. Auch hier zeigte sich, dass die ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure und Ölsäure einen erheblichen Einfluss auf den Umsatz von Oleoyl-CoA hatten, während Palmitinsäure die Acyltransferase-Reaktion nur gering beeinflusste.

Palmitoyl-CoA wurde durch die LAT im Vergleich zu den anderen beiden CoA-Verbindungen am geringsten in das LPC inkorporiert. Durch Zugabe von Arachidonsäure und Ölsäure kam es zu einer kompletten Inhibition des Palmitoyl-CoA-Einbaus. Der Zusatz von Palmitinsäure dagegen zeigte keinen Einfluss.

Die Ergebnisse können zum Einen die Differenzen in der Affinität des Enzyms zu den 3 Fettsäuren reflektieren, wie sie bereits in den unterschiedlichen  $K_M$ -Werten gezeigt wurden. Andererseits kann es ebenfalls auf die unterschiedliche Löslichkeit und damit der unterschiedlichen Verfügbarkeit von Arachidonsäure, Ölsäure und Palmitinsäure, wie es für die Acyl-CoA-Verbindungen diskutiert wurde, hinweisen.

1-Acyl-Phosphatidylethanolamin (LPE) als Lysoakzeptor: Es war das Ziel der Studie, die enzymatische Aktivität für 3 Lysoakzeptoren LPC, LPI und LPE zu messen, da diese 3 die Hauptphospholipide darstellen, die an der Austauschreaktion von Fettsäuren in T-Lymphozyten beteiligt sind (TROTTER et al., 1982; GOPPELT et al., 1985). Wenn LPE im Puffer wie LPC oder LPI im Ultraschallbad behandelt wurde, wurde die Lösung

opaleszent und war nicht geeignet für optische Messungen. Deshalb wurde ein anderes Protokoll für dieses Lysophospholipid verwendet. Im Assay zeigte LPE ein untypisches Verhalten. Auch bei extrem hohen Konzentrationen (300 nmol/ml) war weiterhin eine nahezu lineare Zunahme der initialen Anstiegsgeschwindigkeit anstatt einer Sättigungsreaktion wie bei den anderen Lysoverbindungen zu beobachten. Offenbar war der meiste Anteil des LPE nicht als Substrat für das Enzym zugänglich. LPE wurde deshalb von den Studien ausgeschlossen, da es nicht möglich war, Enzymmessungen unter definierten Bedingungen durchzuführen.

Effekt der mitogenen Stimulation von T-Lymphozyten auf die Eigenschaften der LAT: T-Lymphozyten wurden für 30 und 120 Minuten mit Concanavalin A stimuliert. Die Plasmamembran der Kontrollzellen und stimulierten Zellen wurden präpariert und die Aktivität der LAT miteinander verglichen. Die Aktivität der LAT wurde durch die vorangegangene Stimulation mit Concanavalin A gesteigert. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit wurde um etwa 60-70% in allen 3 Meßsystemen erhöht. Es wurde die Reaktion Arachidonyl-CoA mit LPC und LPI und Palmitoyl-CoA mit LPC als Lysoakzeptor verwendet. Die gesteigerte Aktivität wurde durch den Anstieg in den  $V_{max}$ -Werten verursacht, während die  $K_M$ -Werte im Wesentlichen unverändert blieben. Die beobachtete präferenzielle Inkorporation von ungesättigten Fettsäuren in aktivierten T-Lymphozyten ist deshalb durch die gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit verursacht. Eine Veränderung der Affinität des aktivierten Enzyms zu seinem Substrat war nicht zu verzeichnen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die LAT präferenziell ungesättigte Fettsäuren in Lysophosphatidakzeptoren inkorporiert. Im Vergleich der beiden untersuchten Fettsäuren wurde diejenige mit einer höheren Anzahl von Doppelbindungen bevorzugt. Mit diesen Ergebnissen konnten erstmals nach der Michaelis-Menton-Kinetik  $K_M$ -Werte und  $V_{max}$ -Werte für dieses Enzym beschrieben werden. Unter Verwendung des neu entwickelten optischen Testes ist damit eine wesentliche Charakterisierung der LAT gelungen.

Nach Beendigung der experimentellen Arbeiten wurden in den folgenden Jahren wenige Untersuchungen zur LAT durchgeführt (KERKHOFF et al., 1996; KERKHOFF et al., 1998). In diesen Experimenten konnten die erzielten Ergebnisse bestätigt werden. Auch bei Verwendung einer anderen Tierspezies (Schweinemilz anstatt Kalbsthymus) zeigte sich eine eindeutige Substratspezifität der LAT für ungesättigte Fettsäuren. Ebenso wurde die kompetitive Hemmung der Enzymaktivität durch freie Fettsäuren nachgewiesen.

Bei Untersuchungen zur Topologie des Enzyms konnten 2 unterschiedliche Lokalisationen identifiziert werden. Aufgrund des Nachweises im Überstand wurde ein Enzym als periphere LAT und ein membrangebundenes Enzym als integrale LAT bezeichnet (KERKHOFF et al., 1996). Die enzymatische Charakteristik der beiden Enzyme war jedoch sehr ähnlich, so dass von einem Isoenzym ausgegangen werden kann. Bisher ist es aufgrund der Labilität des Proteins nicht gelungen, die LAT ausserhalb von Membranen aufzureinigen und das Enzym zu sequenzieren (KERKHOFF et al., 1996; KERKHOF et al., 2000).

## 5. Zusammenfassung

Veränderungen des Lipidmetabolismus spielen bei der Aktivierung von T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass während der mitogeninduzierten Aktivierung von Kaninchen-T-Lymphozyten vermehrt ungesättigte Fettsäuren, vor allem die 4-fach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure in die Phospholipide inkorporiert werden. Schlüsselenzyme des Reacylierungsprozesses sind die Acyltransferasen. Ziel der Doktorarbeit war die Charakterisierung der Lysophosphatid Acyltransferase (LAT) in Lymphozyten.

Mit Hilfe einer optischen Messtechnik wurden drei Lysoacylverbindungen als Akzeptor von aktivierten Fettsäuren untersucht. Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die LAT präferenziell ungesättigte Fettsäuren in Form einer Acyl-CoA-Verbindung in Lysophosphatidakzeptoren inkorporiert. Beim Vergleich der ungesättigten Fettsäuren, Oleoyl-CoA und Arachidonyl-CoA wurde diejenige mit der höheren Anzahl von Doppelbindungen bevorzugt. Die gesättigte Fettsäure Palmitoyl-CoA wurde nicht oder nur in geringem Umfang in Lysophosphatidakzeptoren transferiert. Freie Fettsäuren haben einen inhibierenden Effekt auf die Acylierungsreaktion von Acyl-CoA-Verbindungen. Mit diesen Ergebnissen konnten erstmals nach der Michaelis-Menton-Kinetik  $K_M$ -Werte und  $V_{max}$ -Werte für dieses Enzym beschrieben werden. Bei Stimulation der T-Lymphozyten mit Concanavalin A wurde die Aktivität der LAT um etwa 60-70% gesteigert. Ursache der gesteigerten Aktivität war ein Anstieg der  $V_{max}$ -Werte bei unveränderten  $K_M$ -Werten.

Unter Verwendung des neu entwickelten optischen Testes ist damit eine wesentliche Charakterisierung der LAT gelungen.

---

## 6. Literatur

- BARTLETT, K., BARTLETT, P., BARTLETT, N., SHERRATT, H.S.A.  
Biochem. J. 1985; 229: 559-560.
- BESTERMAN J.M., DURONIO V., CUATRECASAS P. J. Biol. Chem. 1986;  
83: 6785-6789.
- CONSTANTINIDES, P.P., STEIM, J.M. J. Biol. Chem. 1985; 260: 7573-7580.
- EIBL, H., HILL, E.E., LANDS, W.E.M. Eur. J. Biochem. 1969; 9: 250-258.
- FERBER, E., DE PASQUALE, G., RESCH, K. Biochim. Biophys. Acta 1975;  
398: 364.
- FERBER, E., RESCH, K. Biochim. Biophys. Acta 1973; 296: 335-349.
- FOERSTERMANN, U., GOPPELT-STRUEBE, M., FROELICH, J.C., BUSSE,  
R. Pharm. Exp. Therap. 1986; 238: 352-359.
- GOPPELT, M. KÖHLER, L., RESCH, K. Biochim. Biophys. Acta 1985; 833:  
463-472.
- GOPPELT, M, RESCH, K. Anal. Biochem. 1984; 160: 152-156.
- HILL, E.E., LANDS, W.E.M. Biochim. Biophys. Acta 1968; 152: 645-648.
- HASEGAWA-SASAKI, H., OHNO, K. Biochim. Biophys. Acta 1975; 380: 486-  
495.
- IRITANI, N., IKEDA, Y., KAJITANI, H. Biochim. Biophys. Acta 1984; 793:  
416-422.
- IRVINE, F.R. Biochem. J.; 204: 3-16.
- KERKHOF, C., GEHRING, L., HABBEN, K., RESCH, K., KAEVER, V.  
Biochim Biophys. Acta 1996; 1302: 249-256.
- KERKHOF, C., HABBEN, K., GEHRING, L., RESCH, K., KAEVER, V. Arch.  
Biochem. Biophys. 1998; 351: 220-226.

- KERKHOF, C., TRÜMBACH, B., GEHRING, L., HABBEN, K., SCHMITZ, G.,  
KAEVER, V. Eur. J. Biochem. 2000; 267: 6339-6345.
- LANDS, W.E.M., INOUE, M., SUGUIRA, Y., OKUYAMA, H. J. Biol. Chem.  
1982; 257: 14968-14972.
- MAGARGAL, W.W., DICKINSON, E.S., SLAKEY, L.L. J. Biol. Chem. 1978;  
253: 8311-8318.
- MCKEAN, M.L., SMITH, J.B., SILVER, M. J. Biol. Chem. 1982; 257: 11278-  
11283.
- MIKI, Y., HOSAKA, K., YAMASHITA, S., HANDA, H., NUMA, S. Eur. J.  
Biochem. 1977; 81: 433-441.
- RODE, H.N., SZAMEL, M., SCHNEIDER, S., RESCH, K. Biochim. Biophys.  
Acta 1982; 688: 66-74.
- SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. Science 1972; 175: 720-731.
- SKIPSKI, V.P., BARCLAY, M. Methods in Enzymology; 530-612.
- SMITH, R.H., POWELL, G.L. Arch. Biochem. Biophys. 1986; 244: 357-360.
- SUMPER, M., TRÄUBLE, H. FEBS Lett. 1973; 30: 29-34.
- TROTTER J., FLESCHE I., SCHMIDT B. FERBER E. J. Biol Chem. 1982; 257:  
1816-1823.
- WISE, R., SUN, G.Y., MACQUARRIE, R. Eur. J. Biochem. 1980; 109: 201-  
206.
- WOLF, R.A., GROSS, R.W. Biol. Chem. 1985; 260: 7295-7303.



## 7. Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Resch danke ich für die Überlassung des Themas und Betreuung der Promotionsarbeit. Sein stetes Interesse an dem Fortschritt der Untersuchungen und die Diskussionen waren sehr wertvoll für das Gelingen der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Goppelt-Struebe, für die unermüdliche persönliche Beratung während der Entstehung und für die vielen Ratschläge und Anregungen im Verlauf dieser Arbeit. Sie hat meine Promotionsarbeit in vorbildlicher Weise betreut. Frau Prof. Dr. rer. nat. Goppelt-Struebe verdanke ich die Vermittlung der Prinzipien wissenschaftlichen Arbeitens.

Frau M. Golombek hat mir bei allen praktischen Problemen wichtige Hilfestellungen gegeben.

Insgesamt möchte ich die kooperative Zusammenarbeit mit den verschiedenen Arbeitsgruppen im pharmakologischen Labor hervorheben.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meinem Mann für sein Verständnis und seine persönliche Unterstützung sowie meinen Eltern, die mir den Zugang zur Medizin eröffnet haben.

## 8. Lebenslauf

*Name:* Fiesinger-Köhler

*Vorname:* Sabine

Geboren am 04.11.1960 in Lüchow als Tochter des Elektromeisters Rolf Fiesinger und seiner Ehefrau Helga, geb. Naß.

*Familienstand:* verheiratet, 1 Tochter Miriam (06.11.1996)

*Religion:* ev. luth

### Ausbildungsgang

1967-1971 Volksschule Lüchow

1971-1980 Gymnasium Lüchow

1980-1986 Medizinstudium an der Medizinischen Hochschule Hannover

1982 Physikum

1983 1. Staatsexamens der ärztlichen Prüfung

1985 2. Staatsexamens der ärztlichen Prüfung

01.12.1986 Erhalt der Approbation als Ärztin nach Bestehen des 3. Staatsexamens

01.06.1987 -  
31.12.1988 Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Peine, Abt. Unfallchirurgie, Dr. Schellmann

- 01.01.1989 -  
31.12.1992                      Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Peine, Abt.  
Allgemeinchirurgie, Dr. Forth
- seit 01.01.1993                      Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Peine, Abt.  
Unfallchirurgie, Dr. Schellmann, seit 1.7.97 bei  
neuem Chefarzt Dr. Wietoska
- 11.05.1993                      Zusatzbezeichnung Rettungsmedizin
- 03.08.1994                      Erhalt der Gebietsbezeichnung Chirurgie
- 26.06.1996                      Erhalt der Teilgebietsbezeichnung Unfallchirurgie

## 9. Erklärungen

### Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nrn. 5 und 6

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung der Lysophosphatid Acyltransferase in Membranen von T-Lymphozyten“ im Institut für Pharmakologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. K. Resch mit Unterstützung von Frau Prof. Dr. M. Goppelt-Strübe ohne sonstige Hilfsmittel durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden nicht veröffentlicht.

Hannover, den

.....  
(Unterschrift)