

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung der Proteinkinase C für die Regulation des
proteinvermittelten Fettsäuretransportes in humanen Thrombozyten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Julia Henriette Preiß

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F. Guthmann
2. Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. K. Seeger
3. Prof. Dr. med. M. Rüdiger

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Fettsäurestoffwechsel von Zellen	7
1.2	Aufnahme langkettiger Fettsäuren über die Zellmembran	7
1.2.1	Freie Diffusion von Fettsäuren und das Flip-Flop-Modell	8
1.2.2	Erleichterter proteinvermittelter Transport von Fettsäuren	9
1.2.3	Membranäre Transportproteine für langkettige Fettsäuren	12
1.3	Fatty Acid Translocase FAT/CD 36	12
1.3.1	Molekulare Eigenschaften und biochemische Struktur	12
1.3.2	FAT/CD36 als Transportprotein für langkettige Fettsäuren	15
1.3.3	Klinische Bedeutung von FAT/CD36	18
1.4	Thrombozyten als Modell der Fettsäureaufnahme	19
2	Fragestellung	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.2	Geräte und Hilfsmittel	24
3.3	Methoden	25
3.3.1	Isolierung humaner Thrombozyten	25
3.3.2	Palmitinsäureaufnahmeexperimente humaner Thrombozyten	27
3.3.3	Präparation der Thrombozytenmembran	29
3.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
3.3.5	2D-Gelelektrophorese	33
3.3.6	Westernblot	34
3.3.7	Autoradiographie	36
3.3.8	Einsatz von Radiochemikalien	37
3.3.9	Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Präparation humaner Thrombozyten	38
4.2	Palmitinsäureaufnahme von humanen Thrombozyten	39

4.3	Untersuchungen zur Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten	41
4.3.1	Bestimmung des Kontrollwertes	41
4.3.2	Einfluss des Phosphatase 1 und 2a Inhibitors Okadaic Säure auf die Palmitinsäureaufnahme von Thrombozyten.....	42
4.3.3	Bedeutung der verschiedenen Proteinphosphorylierungswege für die Palmitinsäureaufnahme	43
4.3.4	Effekt von Stimulatoren und Inhibitoren der Proteinkinase C auf die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten.....	45
4.4	Nachweis der Aktivierung und Inhibition der PKC α/β in humanen Thrombozyten....	48
4.5	Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen in der Membran humaner Thrombozyten	49
4.6	Zweidimensionale Elektrophorese und Autoradiografie.....	50
4.7	Nachweis der Phosphorylierung von CD36 durch PMA-Stimulation	50
5	Diskussion	53
5.1	Humane Thrombozyten und Fettsäuren	53
5.2	Präparation humaner Thrombozyten	53
5.3	Palmitinsäureaufnahme von humanen Thrombozyten.....	54
5.3.1	Einfluss intrazellulärer Phosphorylierung auf die Palmitinsäureaufnahme	54
5.3.2	Nachweis der PKC – Aktivierung.....	56
5.4	Phosphorylierung des Membranproteins CD36 durch Proteinkinase C.....	57
5.5	Ausblick	59
5.5.1	Bedeutung unserer Ergebnisse für die medizinische Klinik	60
6	Zusammenfassung.....	61
7	Literatur.....	62

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD36	Leukozyten-Differenzierungsfaktor 36 (cluster of differentiation 36)
DAG	Diacylglycerol
IgG	Immunglobulin G
FA-uptake	Fettsäureaufnahme
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAT	Fettsäure-Translokase (fatty-acid translocase)
FFA	Freie Fettsäure (free fatty acid)
HSA	humanes Serumalbumin
PA	Palmitinsäure (palmitic acid)
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP1	Proteinphosphatase Typ 1
PP2a	Proteinphosphatase Typ 2a
PP2b	Proteinphosphatase Typ 2b
PPAR	nuclear peroxisome proliferator receptor
PPP	Plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)
PRP	Plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
PTK	Proteintyrosinkinase
SDS	Natriumlaurylsulfat (Sodium-dodecyl-sulfate)
Ser	Serin
SSM	Sulfo-N-Succinimidyl-Myristat
SSO	Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat
SR-B1	„Scavenger“-Rezeptoren der Klasse B
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylenamin
Thr	Threonin

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Thrombozytenpräparationen
Tabelle 2:	Kontrollwerte der Palmitinsäureaufnahme

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	FAT/CD36: Schematische Darstellung nach: Swis-Prot (Version 44.36) und NetPhos (Version 2.0)
Abbildung 2a:	Konzentrationsabhängigkeit der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten
Abbildung 2b:	Konzentrationsabhängigkeit der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten (Ausschnitt)
Abbildung 3:	Palmitinsäureaufnahme in Abhängigkeit von der Okadaic Säure Konzentration
Abbildung 4:	Experimente zur initialen Palmitinsäureaufnahme
Abbildung 5:	Palmitinsäureaufnahme unter Aktivierung und Inhibition der PKC
Abbildung 6:	Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliche Signaltransduktionswege
Abbildung 7:	Translokation der PKC α/β durch Stimulation mit PMA
Abbildung 8:	Aktivierung und Hemmung der PKC α/β
Abbildung 9:	Nachweis phosphorylierter Proteinbanden
Abbildung 10:	Nachweis von phosphorylierten Proteinen der Thrombozytenmembran
Abbildung 11:	Phosphorylierung von CD36 in humanen Thrombozyten

1 Einleitung

1.1 Fettsäurestoffwechsel von Zellen

Fettsäuren stellen als wichtiges Substrat der β -Oxidation eine bedeutende Energiequelle für Zellen dar. Fettsäuren sind essentiell für die Synthese von Triglyzeriden, Phospholipiden, Cholesterolestern und Prostaglandinen und sind folglich ein wesentlicher Bestandteil der Membransynthese. Die Fettsäureacylierung von Proteinen kann die Lokalisation und Funktion von Proteinen beeinflussen [81, 92]. In der Funktion als Signaltransduktoren steuern Fettsäuren viele verschiedene zelluläre Prozesse [8, 54, 131], z.B. modulieren sie die Aktivität von Ionenkanälen [113] und sie beeinflussen die Expression von Genen, die in die Zelldifferenzierung und in den Lipidstoffwechsel involviert sind [12, 43, 44]. Die Rolle langkettiger Fettsäuren in der Pathogenese chronischer Erkrankungen wie Atherosklerose, Carcinomen und Infektionskrankheiten verdeutlicht deren Funktionsvielfalt [73, 109, 145]. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass der Stoffwechsel von Fettsäuren, einschließlich der zellulären Aufnahme und des Transport, einer strengen Regulation unterliegt.

1.2 Aufnahme langkettiger Fettsäuren über die Zellmembran

Hepatozyten und Adipozyten sind in der Lage, nicht-essentielle langkettige Fettsäuren *de novo* zu synthetisieren. Die Mehrzahl der Zellen kann aber keine ausreichende Menge an Fettsäuren synthetisieren oder speichern, sie sind daher auf die Aufnahme exogener Fettsäuren aus dem Plasma angewiesen. Im Plasma sind Fettsäuren aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften an Albumin gebunden. Löslichkeit und Transport von Fettsäuren werden von dieser Bindung bestimmt. Die Fettsäureaufnahme von Zellen ist abhängig von der Konzentration der ungebundenen, freien Fettsäure und folglich von dem Verhältnis von Fettsäure : Albumin [6] und der jeweiligen Stoffwechselsituation. Denn je nach Stoffwechselsituation zeigen verschiedene Zelltypen eine Abhängigkeit ihrer Syntheseleistung von der exogenen Zufuhr freier Fettsäure. Adulte Typ II-Pneumozyten erreichen ihre maximale Synthese von Dipalmitoylphosphatidylcholin, einem Bestandteil des pulmonalen Surfactant, nur bei ausreichendem Vorhandensein von exogener, freier Palmitinsäure (16:0) [19, 29, 99]. Dutta-Roy et al. zeigte die Abhängigkeit der Thromboxan A₂-Synthese (TxA₂) von der Aufnahme freier Arachidonsäure (20:4) in humanen Thrombozyten [45]. Um in die Zellen zu gelangen, müssen die Fettsäuren die Zellmembran passieren. In vielen Fällen ist der Membrantransfer ein kritischer

Schritt in der Regulation des Substratstoffwechsels. Biochemische und biophysikalische Untersuchungen von Hamilton und Abumrad et al. zeigten, dass für die zelluläre Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in die Zelle zwei verschiedene, kontrovers diskutierte Mechanismen existieren: die passive Diffusion durch den Phospholipid-Bilayer und einen erleichterten proteinvermittelten Transport [2, 67].

1.2.1 Freie Diffusion von Fettsäuren und das Flip-Flop-Modell

Eine genaue Beschreibung der freien Diffusion langkettiger Fettsäuren stammt von Hamilton [67] und basiert auf einem von Noy et al. beschriebenen, physikalisch-chemischen Modell für die Zellmembranpassage hydrophober Substanzen [111]. Hamilton zeigte, dass der Transport von Fettsäuren ohne Beteiligung von Membranproteinen stattfindet und nur die freie Diffusion entscheidend ist. Dabei sei auch die Diffusionsgeschwindigkeit ausreichend, um die Zellen mit genügend Substrat zu versorgen und die Stoffwechsellage aufrecht zu erhalten. Nach Hamilton gehen alle drei Abschnitte der Phospholipidmembranpassage (Adsorption, Transmembranbewegung und Desorption) und auch die Lösung der Fettsäuren von ihrem Transporter Albumin ohne Beteiligung eines weiteren Proteins vorstatten.

Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge können die Lipidmembran passieren. Bei der zellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren konnten jedoch unterschiedliche Transportgeschwindigkeiten festgestellt werden, wobei angenommen werden kann, dass die Transportrate von Fettsäuren von deren Kettenlänge und dem spezifischen Aufbau der Lipidmembran abhängt [66, 88]. Hamilton erklärt daher die freie Diffusion langkettiger Fettsäuren mit einem so genannten „flip-flop“-Mechanismus, bei dem nur die protonierten Fettsäuren die hydrophoben Anteile der Membran passieren. Danach klappen die protonierten Fettsäuren entlang eines Konzentrationsgradienten von der äußeren zur inneren Schicht der Lipid-Doppelmembran. Nach Hamiltons Ergebnissen reicht die Geschwindigkeit des „flip-flop“-Mechanismus aus, um den Bedarf der Zellen an Fettsäuren zu decken.

Obwohl das Modell der freien Diffusion gut untersucht ist, gibt es Einwände anderer Autoren, wonach die freie Diffusion nicht den wesentlichen Mechanismus der Fettsäureaufnahme *in vivo* darstellt. Zum einen konnte der Transfer von Fettsäuren vom Transporter Albumin zur Lipidmembran nur bei sehr hohem und unphysiologischen molaren Verhältnis von Fettsäure zu Albumin gezeigt werden, während bei einem physiologischen, niedrigerem molaren Verhältnis von 0,25-1,0 die Bindung zwischen der Fettsäure und dem Albumin so stark ist, dass die

Desorption der Fettsäure vom Albumin der transportlimitierende Schritt sein müsste. Hamilton setzte bei seinen Untersuchungen zum „flip-flop“-Modell unphysiologisch hohe Konzentrationen an extrazellulärer Fettsäure ein. Zum anderen gibt es Einwände, wonach die durch „flip-flop“ maximal erreichbare Transportgeschwindigkeit von Fettsäuren für den Metabolismus bestimmter Zelltypen nicht ausreichend ist [87, 88].

Für metabolisch einfach strukturierte Zellen wie Erythrozyten genügt der Transfer langkettiger Fettsäuren per Diffusion [20]. Allerdings ist die Aufnahme für metabolisch komplexere Zellen wie Myozyten und Adipozyten durch „flip-flop“ zu langsam, um den Fettsäurestoffwechsel der Zellen ausreichend zu unterstützen [87]

1.2.2 Erleichterter proteinvermittelter Transport von Fettsäuren

In den letzten Jahren wurde das Modell der freien Diffusion als ausschließlicher Transportmechanismus für Fettsäuren in die Zellen überzeugend widerlegt. Bis heute wurden an verschiedenen Zellen Untersuchungen zur Fettsäureaufnahme durchgeführt und viele dieser Zellen zeigen die gleichen kinetischen Eigenschaften wie Sättigbarkeit der Fettsäure-Aufnahme und kompetitive Hemmung des Transportes. Die bisherigen Studien lassen darauf schließen, dass der überwiegende Anteil der Fettsäureaufnahme von einem proteinvermittelten Prozess bestimmt wird [2].

1.2.2.1 Biochemische Mechanismen der Fettsäureaufnahme

Die ersten ausführlichen Studien, die den proteinvermittelten Transport langkettiger Fettsäuren über die Zellmembran belegen, wurden an Rattenadipozyten durchgeführt [5, 6]. Abumrad et al zeigten eine nicht-lineare Sättigungskinetik der Fettsäureaufnahme in Abhängigkeit von der Konzentration ungebundener Fettsäure. Durch die Daten von Richieri et al [119], die das Fluoreszenz-basierte Verfahren „ADIFAB“ (acrylodan-derivatized intestinal fatty acid binding) entwickelten, wurde es möglich, die Konzentration freier Fettsäuren im Äquilibrium mit den an Protein gebundenen Fettsäuren zu bestimmen. Der dadurch ermittelte K_m -Wert für die ungebundene freie Fettsäure beträgt etwa 7 nM und entspricht damit der physiologischen Konzentration freier Fettsäure im Blut, die im Bereich von 7,5 nM +/- 2,5 nM liegt [120]. Damit wird erklärt, dass nahezu die gesamte Fettsäureaufnahme in diesem physiologischem Konzentrationsbereich der freien Fettsäure stattfindet. Die Kinetik der Fettsäureaufnahme von

Adipozyten besteht bei physiologischer Konzentration freier Fettsäure aus zwei Komponenten, zu 90 % aus einem sättigbarem Prozess, und aus einer nicht-sättigbaren Komponente, die nur bei hohen Fettsäurekonzentrationen eine Rolle spielt [138]. Physiologisch treten solch hohe Konzentrationen an freier Fettsäure beispielsweise im Rahmen der intravaskulären Lipolyse auf [6].

Neben Adipozyten gibt es auch andere Zelllinien, an denen die Sättigbarkeit des Fettsäuretransportes untersucht wurde, darunter an Hepatozyten [137], an Myozyten [96], an Typ-II-Pneumozyten [100] und an Enterozyten [31, 148]. Bonen et al. [24] zeigten, dass der K_m -Wert für die Palmitinsäureaufnahme über sarkolemmale Membranvesikel („giant vesicles“) in Myozyten 6 nM beträgt und die V_{max} für die Aufnahme 1,8-fach höher in roten als in weißen Muskelzellen ist, was durch die höhere Metabolisierungsrate von Fettsäuren in roten Muskelzellen erklärbar ist.

Turcotte et al. [149] stellten fest, dass mit dem Bedarf an Fettsäuren auch deren Aufnahme in die Zellen steigt; so zeigte er an isolierten Skelettmuskelzellen, dass bei Muskelkontraktion die Fettsäureaufnahme in die Zellen und auch die Oxidation von Palmitinsäure erhöht war. Einen direkten Zusammenhang zwischen Muskelkontraktion und steigendem Fettsäuretransport konnten auch Bonen et al. [23] und Luiken et al. [95] zeigen.

Die kompetitive Hemmung der Fettsäureaufnahme ist ein weiteres Argument für eine erleichterte proteinvermittelte Reaktion. Abumrad et al. [4] zeigten an isolierten Rattenadipozyten die kompetitive Hemmung zwischen verschiedenen langkettigen Fettsäuren bei der zellulären Aufnahme. Kurzkettige Fettsäuren unter 8 C-Atomen zeigten nicht das Verhalten der kompetitiven Hemmung, was für eine Substratspezifität der an der Aufnahme beteiligten Proteine spricht. Sorrentino et al. [132] bestätigten die Ergebnisse durch Untersuchungen an isolierten Hepatozyten, bei denen Ölsäure (14:0) und Palmitinsäure (16:0) ihre Aufnahme in die Zelle gegenseitig kompetitiv hemmten.

Die Sensitivität des Fettsäuretransfers gegenüber proteinmodifizierenden Substanzen gilt auch als wichtiges biochemisches Argument für einen proteinvermittelten Membrantransport. Bisher wurden viele verschiedene Inhibitoren der Fettsäureaufnahme von Zellen beschrieben. Zum Beispiel hemmt Phloretin, ein Inhibitor von Glukose- und Anionentransportern, die Fettsäureaufnahme von Adipozyten reversibel [5, 6]. Während eine irreversible Hemmung durch Diisothioldisulfonische Säure (DIDS) [70] und die reaktiven Fettsäurederivate Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat (SSO) und -myristat (SSM) [69, 71] erfolgt. Guthmann et al. [63] beobachteten eine Erniedrigung der Fettsäureaufnahme bei Typ-II-Pneumozyten durch Phloretin,

Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat und Bromobiman. In Hepatozyten hemmt 11-Azistearat, ebenfalls ein Fettsäurederivat, die Aufnahme von Fettsäuren selektiv und irreversibel [125].

Auch gegenüber Proteaseaktivität scheint die Fettsäureaufnahme eine relative Sensitivität zu besitzen. Durch eine vorhergehende Hitzedenaturierung oder Protease-Behandlung [147] konnte ebenso wie durch die proteolytische Enzyme Pronase und Trypsin [5, 96] eine Hemmung der Fettsäureaufnahme gezeigt werden.

Antikörper, die gegen bestimmte Membranproteine gerichtet sind, haben auch die Eigenschaft die Fettsäureaufnahme zu beeinflussen. Unter anderem beschrieben Berk et al. [20] und Zhou et al. [157] einen Antikörper, der gegen die Aspartat-Aminotransferase gerichtet ist und in der Lage ist, die Ölsäureaufnahme von Hepatozyten und Adipozyten zu senken. Dutta-Roy et al. [46] konnten mit einem gegen das Membranprotein Fettsäure-Translokase CD36 (FAT/CD36) gerichteten monoklonalen Antikörper die Arachidonsäureaufnahme in Thrombozyten vermindern.

Die Energieabhängigkeit eines Prozesses steht, wie die Sättigbarkeit und die Hemmbarkeit, als ein wichtiger biochemischer Beweis für einen proteinvermittelten Transport. Es gibt Studien, die belegen, dass unter Energieentzug, die Aufnahme von Fettsäure drastisch gesenkt werden kann. So führt die ATP-Depletion (Adenosin-5'-triphosphat) von Hepatozyten zu einer Senkung der Ölsäureaufnahme über 50 % [137]. Guthmann et al. [63] konnten an Typ-II-Pneumozyten eine reversible Hemmung der Palmitinsäureaufnahme um 65 % feststellen, wenn diese unter ATP-Depletion durchgeführt wurde.

Kerkhoff et al. [86] zeigten, dass die Arachidonsäureaufnahme von humanen Endothelzellen eine Temperaturabhängigkeit aufweist, was ebenfalls als Charakteristik eines proteinvermittelten Prozesses gilt. Bei 4 °C betrug die initiale, von der Metabolisierungsrate unabhängige Aufnahme von Arachidonsäure noch 10 % der Aufnahme bei 37 °C.

Die Ergebnisse über die Sättigbarkeit der Fettsäureaufnahme und deren Hemmbarkeit mittels proteinmodifizierender Substanzen und gerichteter Antikörper belegen die Beteiligung spezifischer Membranproteine am Transport langkettiger Fettsäure über die Zellmembran. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass bei physiologischen Fettsäurekonzentrationen der überwiegende Anteil der gesamten Fettsäureaufnahme einem proteinvermittelten Transport

unterliegt. Bisher wurden mehrere Proteine, die am transmembranären Transport langkettiger Fettsäure beteiligt sind, identifiziert; unter anderem gibt es eine detaillierte Arbeit über Rezeptorproteine für langkettige Fettsäuren in *Escherichia coli* [43].

1.2.3 Membranäre Transportproteine für langkettige Fettsäuren

Folgende Proteine, die am Transport für langkettige Fettsäuren beteiligt sind, wurden bisher identifiziert und beschrieben:

- das „Fatty Acid Transport Protein“ (FATP, 63 kDa) mit Sequenzähnlichkeit zur „Very long chain fatty-acid-Acyl CoA synthetase“ [124, 135]
- das „Plasma Membrane Fatty Acid Binding Protein“ (FABPpm, 43 kDa), es entspricht einer membranassoziierten Form der mitochondrialen Aspartat-Aminotransferase [20, 136]
- der renale „Fatty Acid Receptor“ (FAR, 56-60 kDa) [52]
- das „Adipocyte Differentiation-Related Protein“ (ADRP, 53 kDa) [126]
- das „Membran Fatty Acid Binding Protein“ (FABP, 22 kDa), es entspricht dem „Caveolin-1“ [146] und
- die „Fatty Acid Translocase“ (FAT/CD36, 88 kDa) [5, 6]

Die „Fatty Acid Translocase“ (FAT/CD36) scheint eine wichtige Stellung beim Transport langkettiger Fettsäuren über die Zellmembran einzunehmen und ist von den bekannten Transportproteinen am besten untersucht. In Herz- und Skelettmuskelzellen wird FAT/CD36 gemeinsam mit dem cytoplasmatischen „Fatty Acid Binding Protein (FABP) [150] und diese Co-Expression von FABP und FAT/CD36 stimuliert die Fettsäureaufnahme und –verstoffwechslung [106].

1.3 Fatty Acid Translocase FAT/CD 36

1.3.1 Molekulare Eigenschaften und biochemische Struktur

Harmon & Abumrad identifizierten und isolierten bei Untersuchungen mit radioaktiv markierten Succinimidylestern von langkettigen Fettsäuren, welche den Fettsäuretransport in Adipozyten hemmten [69], ein 88 kDa Membranprotein, die als „Fatty Acid Translocase“ (FAT) benannt wurde. Abumrad et al. [3] fand anhand von Untersuchungen an Adipozyten, eine Homologie

zwischen der FAT und dem CD36 humaner Thrombozyten, das auch als Glykoprotein IV (GP IV) [112] und Glykoprotein IIIb (GP IIIb) [32] beschrieben wurde. Erstmals wurde CD36 aus humanen Thrombozyten 1989 als ein Thrombospondinrezeptor isoliert [142].

CD 36 ist ein integrales membranäres Glykoprotein und wurde in einer Vielzahl von Zelltypen nachgewiesen, so in hämatopoetischen Zellen wie Megakaryozyten, Monozyten, Thrombozyten [154], in Adipozyten [3], Herz- und Skelettmuskelzellen [95], in mikrovaskulären und intestinalen Endothelzellen [116], in Epithelzellen der Retina und der Brustdrüse und in Typ-II-Pneumozyten [63]. Neben der Funktion als Transportprotein für langkettige Fettsäuren in Muskel- und Fettzellen, dient es z.B. auch als Zelladhäsionsmolekül oder als „Scavenger“-Rezeptor der Klasse B in anderen Zelltypen. Das macht die große Vielfalt der Funktionen und Liganden in Abhängigkeit vom Zelltyp von CD 36 deutlich.

CD 36 ist ein Glykoprotein und zählt auch zu den „Scavenger“-Rezeptoren der Klasse B [121] wie SR-B1 [7], ein Lipoproteinrezeptor für die hepatische Cholesterinaufnahme [51] und LIMP2 (lysosomal integral membrane protein II), ein Rezeptor mit bislang unbekannter Funktion [151]. Die Familie der „Scavenger“-Rezeptoren ist in der Lage, anionische Phospholipide, apoptotische Zellen und ox-LDL (Lipoproteine geringer Dichte) zu binden und zeichnet sich durch ihre strukturelle Ähnlichkeit aus. So wurde für CD36 [143] und den SR-B1 [37] gezeigt, dass sie aus zwei Transmembrandomänen mit zytoplasmatischen Enden und einer großen stark glykosylierten extrazellulären Domäne aufgebaut sind und in so genannten Caveolae, spezialisierten Mikrodomänen der Zellmembran, lokalisiert sind [16].

Das FAT/CD36-Gen wurde auf dem humanen Chromosom 7q11.2 lokalisiert [50], bei der Ratte auf Chromosom 4 und bei der Maus auf 5. Die Nukleotidsequenz entspricht einem Protein von 471 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 53 kDa. Diese 53 kDa entsprechen der deglykosylierten Form des CD36. Da die extrazelluläre Domäne von CD36 10 potentielle Glykosylierungsstellen aufweist, unterscheidet sich die molekulare Masse in verschiedenen Zelltypen. In der Brustdrüse wurde CD36 als ein 78 kDa-Protein beschrieben und in Thrombozyten, Myozyten und Adipozyten als ein 88 kDa-Protein.

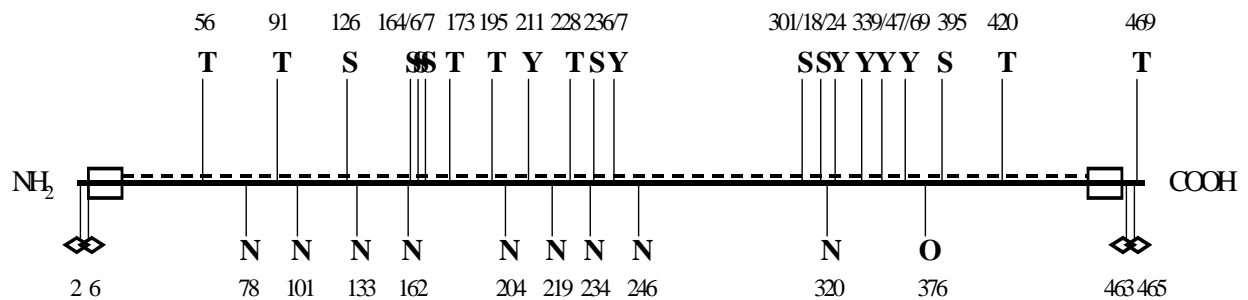
Es wird vermutet, dass die starke Glykosylierung dem Protein einen hohen Schutz vor proteolytischer Aktivität bietet und somit dessen Funktion in proteolytisch aktiven Kompartimenten wie den Lysosomen und in der Umgebung von Entzündungsreaktionen gesichert wird. Da FAT/CD36 nach einer Deglykosylierung mit der Endoglycosidase F von Proteasen schnell angegriffen wird, CD36 aber in hohem Maße endogenen Proteasen ausgesetzt

ist, nimmt die Glykosylierung eine wichtige Stellung zur Sicherung und Stabilisierung der Funktionen von CD36 ein.

Anhand der Aminosäuresequenz von CD36 wurden Modelle für die Primärstruktur entwickelt. Bei dem heute allgemein akzeptierten Modell von Greenwalt et al. [56] besteht CD36 aus zwei hydrophoben Abschnitten von je 22 Aminosäuren nahe den N- und C-terminalen Enden, die den transmembranären Abschnitt darstellen, der von einem cytoplasmatischen Teil von sechs bis elf endständigen Aminosäuren flankiert wird. Tao et al. [143] entdeckten, dass an den Cysteingruppen der cytoplasmatischen Domäne Palmitatgruppen über eine kovalente Thioesterbindung gebunden sind. Es wird vermutet, dass die zwischen den hydrophoben Teilen gelegene große extrazelluläre Domäne eine Haarnadelfigur bildet [3], die möglicherweise durch eine weitere membranassoziierte Domäne stabilisiert wird [56].

FAT/CD36 verfügt über eine Vielfalt verschiedener Funktionen in Abhängigkeit vom Zelltyp. Es gibt mehrere Liganden, die an spezifischen Stellen binden können. In der extrazellulären Domäne von CD36 befinden sich die hauptsächlich N-seitigen Glykosylierungsstellen, und es gibt Aminosäuren, die die Bindungsstellen für Thrombospondin 1 und für oxLDL bilden. Auch für apoptische Zellen und für mit dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* infizierte Erythrozyten [49] werden Bindungsstellen vermutet. Asch et al. [15] konnte an Thrombozyten eine Threonin-gebundene Phosphorylierungsstelle zeigen. Mittels der Bioinformatik-Datenbanken „Swiss-Prot“ (Version 40.36) und „NetPhos“ (Version 2.0) konnten weitere potentielle Phosphorylierungsstellen beschrieben werden. Dabei findet „NetPhos“ für humanes FAT/CD36 acht Serin-gebundene, sieben Threonin-gebundene und sechs Tyrosin-gebundene potentielle Phosphorylierungsstellen. Das extrazelluläre Segment (AS 127-279) der FAT/CD36 weist eine strukturelle Ähnlichkeit von 73 % mit der fettsäurebindenden Domäne des cytosolischen FABP auf.

Abb. 1 FAT/CD36: Schematische Darstellung nach: Swis-Prot (Version 44.36) und NetPhos (Version 2.0)



- Transmembran-Domänen (AS 7-28 und 439-460)
- - - Extrazelluläre Domäne (AS 29-438)
- S,T,Y Phosphorylierungs-Stellen (Serin-, Threonin- oder Tyrosingebunden)
- N,O N- oder O-glykosidische Bindungs-Stellen
- ◇ Palmitoylierungs-Stellen
- 1-471 Position der Aminosäure

Als potentielle Phosphorylierungsstellen gibt „NetPhos“ Aminosäure-Positionen mit einem Vorhersagewert („prediction score“) $\geq 0,5$ an [21].

1.3.2 FAT/CD36 als Transportprotein für langkettige Fettsäuren

FAT/CD36 ist ein multifunktionelles Protein. Neben der Funktion als Kollagen- und Thrombospondinrezeptor für Thrombozyten, als Rezeptor für mit *P falciparum*-infizierte Erythrozyten und als „scavenger“-Rezeptor für apoptische Zellen, hat FAT/CD36 als Transportprotein für langkettige Fettsäuren an Bedeutung gewonnen.

Der erste Hinweis, dass FAT/CD36 als Transporter für langkettige Fettsäuren fungiert, kam von Harmon et al. [69, 71]. Bei ihren Untersuchungen entdeckten sie, dass radioaktiv markierte Derivate von langkettigen Fettsäuren (SSM, Sulfo-N-Succinimidyl-Myristat und SSO, Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat) den Fettsäuretransport um ~70 % in Rattenadipozyten irreversibel hemmen. Diese Derivate waren alle an ein Membranprotein gebunden, das als FAT isoliert und später als

CD36 identifiziert wurde. In Adipozyten konnte gezeigt werden, dass dieses Protein in vitro nur langkettige, aber keine kurzkettigen (weniger als 8 C-Atome) Fettsäuren bindet [17]. Die FAT/CD36 besitzt ein extrazelluläres Segment (AS 127-279), das mit der fettsäurebindenden Domäne des cytosolischen FABP eine strukturelle Ähnlichkeit von 73 % hat.

Vorkommen und Verteilung

Auch die Verteilung von FAT/CD36 in verschiedenen Zelltypen weist auf seine Funktion als Fettsäuretransporter hin. CD36 wird bevorzugt in Zellen exprimiert, die einen hohen Stoffwechselumsatz an Fettsäuren aufweisen wie im Intestinum [31, 93], im Fettgewebe [3] sowie in kardialen [95] und skeletalen Myozyten mit Dominanz der roten, oxidativ aktiven, Zellen [23]. Ebenfalls tritt CD36 in Zellen auf, in denen vermehrt Lipide gespeichert werden [152], oxidierte Lipoproteine geringer Dichte (oxLDL) vermehrt gebunden werden [110] und die Fettsäureaufnahme auch eine wichtige Rolle spielt wie in Makrophagen, in Endothelzellen, in Typ-II-Pneumozyten und in Thrombozyten [63, 86].

Funktionale Expression von CD36

Durch die Expression von CD36 in Ob17PY-Fibroblasten, die normalerweise kein CD36 exprimieren, liess sich eine zuvor nicht vorhandene Komponente der Aufnahme langkettiger Fettsäure nachweisen, die sättigbar ($K_m=4$ nM), hochaffin und phloretin-sensitiv ist [79]. Diese proteinabhängige Komponente macht bei einem physiologischen Verhältnis von freier Fettsäure (FFA) zu humanem Serumalbumin (HSA) von 0,2-0,7 ca. 75 % der Fettsäureaufnahme aus. Bei einem Verhältnis von FFA : HSA > 2 nahm die proteinabhängige Komponente der Fettsäureaufnahme ab und die freie Diffusion der Fettsäuren über die Zellmembran nahm zu. Bei einem Vergleich von transgenen Mäusen, die kein CD36 exprimieren versus erhöhte CD36 Expression im Muskelgewebe, stellten Coburn et al. [33] fest, dass die Fettsäureaufnahme in den „knock-out“ Myozyten (Herz und Muskel) und Adipozyten über 60 % geringer ist als im Wildtyp. Die Fähigkeit der „knock-out“-Mäuse zur körperlichen Anstrengung ist gegenüber Mäusen mit CD36 reduziert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Mäuse unter fettreicher Diät in Kardiomyozyten verstärkt CD36 exprimierten [57] während Mäuse ohne CD36 Expression (CD36^{-/-}) eine etwa 60-80%ige Abnahme von BMIPP (15-(p-iodophenyl)-3-(R,S)-methylpentadecanoic acid) aufweisen, was auch bei Menschen, die kein CD36 exprimieren, beobachtet wurde [33, 53]. Die CD36^{-/-} Mäuse fallen durch eine kardiale Hypertrophie auf, die nach Gabe von kurzkettigen Fettsäuren, die die Zellmembran ohne CD36 passieren, zurückging

[65]. Der limitierende Faktor für den Fettsäureumsatz von Myozyten scheint demnach die proteinvermittelte Aufnahme über die Zellmembran zu sein, die durch erhöhte CD36 Expression steigerbar wird. Am Menschen wurden bislang zwei Typen von CD36-Defizienz beschrieben, die mit verminderter Fettsäureaufnahme in der Herzmuskulatur einhergehen und mit hypertropher Kardiomyopathie assoziiert sind [140].

Zelldifferenzierung

Während der Phase der Zelldifferenzierung und Zellentwicklung wird CD36 vermehrt exprimiert. Die Expression von CD36 ist ein prominenter Marker der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten [3]. Durch eine vermehrte Fettsäureaufnahme steigt die Fettsäurekonzentration in den Zellen an. Es konnte gezeigt werden, dass langkettige Fettsäuren daraufhin die Expression anderer am Fettsäuremetabolismus beteiligter Proteine induzieren können [11, 59]. Sfeir et al. [127] zeigten, dass langkettige Fettsäuren die Expression der CD36mRNA induzieren und damit die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten beeinflussen. Die Expression von CD36 antisense RNA in Prä-Adipozyten vermindert die Aufnahme langkettiger Fettsäure und korreliert somit mit einer Abnahme der Proteinexpression und folglich auch der Differenzierung in diesen Zellen [128]. Tontonoz et al. [144] beschreiben die Aktivierung von PPAR γ (nuclear peroxisome proliferator receptors) die durch Induktion der Expression von CD36 zur Differenzierung von humanen Monozyten und zur verstärkten Aufnahme von oxLDL in die Zellen führt. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass CD36 eine wesentliche Rolle bei der Zelldifferenzierung, bei der Bindung von Lipoproteinen und beim Transport langkettiger Fettsäure spielt und dass bei einem Mangel an CD36 der Lipidstoffwechsel beeinträchtigt ist.

Regulation der Expression von CD36

Die CD36 Expression wird unter anderem durch Substanzen reguliert, die an nukleären Hormonrezeptoren wirken, sogenannte "nuclear peroxisome proliferator receptors (PPAR). Die Formen PPAR α , γ und δ regulieren die Transkription von Genen, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind. Es ist bekannt, dass synthetisch hergestellte Agonisten der PPAR den Triglyceridgehalt im Serum senken. Sie werden als Insulinsensitizer bei Typ II Diabetesbehandlung eingesetzt. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass langkettige Fettsäuren und deren Derivate in der Lage sind, die PPAR-gesteuerte Gentranskription zu stimulieren und folglich die Expression von Proteinen zu modulieren [59]. Alle drei Subtypen des PPAR können die Expression von CD36 regulieren [18, 105]. So wird in Prä-Adipozyten die

CD36 mRNA durch Glitazon, durch langkettige Fettsäuren, durch das Fettsäureanalogon 2-Bromopalmitat [18] und durch PPAR-Agonisten [13, 129, 153] induziert. Langkettige Fettsäuren sind ebenso in der Lage die CD36 Expression zu modulieren, so induzieren sie in isolierten Zellen [58], im Adipozyten, in Enterozyten [116], in der Brustdrüse [133] und in Herzmuskelzellen [57] die CD36 Expression.

Es existiert ein Zusammenhang zwischen dem Lipoproteinstoffwechsel und der CD36 Expression. In humanen Monozyten können oxLDL direkt PPAR γ stimulieren und somit die Expression von CD36 induzieren [144]. Kolleck et al. [89] stellten an Typ-II-Pneumozyten eine Umverteilung von FAT/CD36 aus dem Cytosol in die Membran bei erhöhter intrazellulärer Cholesterinkonzentration fest, was mit einer gesteigerten Palmitinsäureaufnahme einherging. Es konnte gezeigt werden, dass CD36 in der Lage ist Lipoproteine wie VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) und HDL (high density lipoprotein) zu binden [27, 47]. Bei Untersuchungen an Monozyten, die eine CD36-Defizienz aufweisen, ließ sich eine 40 % Verminderung der oxLDL-Bindung zeigen. Man vermutet, dass diese Bindung den Fettsäuretransport erleichtern könnte [1]. Der Einfluss des Lipidmetabolismus auf die FAT/CD36 Expression macht deutlich, dass CD36 metabolisch und ernährungswissenschaftlich eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel spielt.

1.3.3 Klinische Bedeutung von FAT/CD36

Die Zahl der Menschen, die eine CD36-Defizienz aufweisen, ist in den verschiedenen Ethnien unterschiedlich. Zwei Phänotypen der CD36-Defizienz werden unterschieden. Typ I weist eine CD36-Defizienz der Thrombozyten und Monozyten auf und Typ II nur der Thrombozyten. Die Prävalenz der CD36-Defizienz beträgt in der asiatischen Bevölkerung 3-10 % [82, 83], in der afrikanischen Bevölkerung 5-18,5 % [9, 40] und weniger als 0,3 % in der kaukasischen Bevölkerung.

Die klinische Bedeutung der CD36-Defizienz ist weitgehend unklar. Es konnte jedoch beim Menschen gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der CD36-Defizienz und einer Störung in der myokardialen Aufnahme langkettiger Fettsäure und der Pathogenese der Herzhypertrophie gibt. Patienten mit einer CD36-Defizienz zeigen eine reduzierte Fettsäureaufnahme unter Verwendung von ionisierter BMIPP, die szintigraphisch sichtbar gemacht wurde [78, 140]. Es gibt auch einige Studien, die beim Menschen die hypertrophe

Kardiomyopathie, Hypertonus, Hypertriglyceridämie und andere kardiale Erkrankungen mit einer CD36-Defizienz assoziieren [84, 101, 141]. Silverstein et al. [130] beschrieb eine Beteiligung von CD36 an der Entstehung arteriosklerotischer Plaques, wodurch CD36 in der Pathogenese der KHK an Bedeutung gewinnt.

In den letzten Jahren wurden vermehrt Untersuchungen durchgeführt, die die Rolle von CD36 bei der Pathogenese einer Insulinresistenz, des Diabetes und des metabolischen Syndroms mit Adipositas [76, 117, 139] diskutieren. Pathologisch erhöhte Fettsäurespiegel im Blut können gemeinsam mit einer Insulinresistenz auftreten [22] oder sie sogar induzieren [122]. Daher wird davon ausgegangen, dass ein Protein, das die Fettsäureaufnahme steuert, auch Einfluss auf den Blutzuckergehalt und die darauf folgende Insulinantwort nimmt. Die ersten Untersuchungen fanden an spontanen hypertensiven Ratten (SHR) statt, die eine Insulinresistenz aufwiesen. Aitman et al. [10] entdeckten, dass eine CD36-Defizienz in diesen Ratten für einen gestörten Fettstoffwechsel und eine verstärkte Insulinresistenz, als Folge einer Hyperinsulinämie, verantwortlich ist. Nach ausschließlicher Fütterung der spontanen hypertensiven Ratten (SHR) mit kurzkettigen Fettsäuren, die unabhängig von CD36 in die Zellen gelangen, wurde ein Rückgang der Hyperinsulinämie beobachtet [65]. Ibrahimi et al. [79] untersuchten Mäuse mit einer Überexpression an CD36 und stellten fest, dass diese erhöhte Blutglukose und erhöhte Insulinwerte zeigten. Im Gegensatz dazu entwickelten CD36-defiziente Mäuse eine Hypoglykämie [48] und eine Hypoinsulinämie. Weitere Studien bezüglich der Insulinresistenz und CD36 müssen in der Zukunft noch folgen, da diesem Thema bis heute umstritten ist. So z.B. konnte Miyaoko et al. [104] an CD36-defizienten Menschen einen gestörten Glukosestoffwechsel feststellen. Wiederum Yanai et al. [155] konnten zeigen, dass junge CD36-defiziente Menschen keine Insulinresistenz entwickelten. Trotz der bislang guten Ergebnisse durch die Forschung an Tiermodellen und einigen Untersuchungen an CD36-defizienten Menschen, gibt es noch viele Unklarheiten bezüglich der Insulinresistenz, der Arteriosklerose und kardialer Erkrankungen, die in Zukunft durch weitere Untersuchungen verringert werden können.

1.4 Thrombozyten als Modell der Fettsäureaufnahme

Erstmalig wurde CD36 aus humanen Thrombozyten 1989 als ein Thrombospondinrezeptor isoliert und charakterisiert [142]. CD36 gehört zu der Gruppe der Glykoproteine (GP) und übernimmt als GP IV wichtige Funktionen im Stoffwechsel von Thrombozyten. Es ist bekannt, dass CD36 ein multifunktionales Protein ist und ein Rezeptor für Kollagen, für Thrombospondin

(TSP) [56], für malaria-infizierte Erythrozyten [114], für oxidiertes LDL [47] und für langkettige Fettsäuren [3]. In den Thrombozyten spielt CD36 eine wesentliche Rolle bei der Thrombozyten-Kollagen Adhäsion und bei der TSP-abhängigen Thrombozytenaggregation [102, 103]. Die Thrombozytenaggregation wird teilweise durch die intrazelluläre Synthese und Abgabe von Thromboxan A₂ (TxA₂) gesteuert [14]. Thromboxan A₂ (TxA₂) wird aus Arachidonsäure synthetisiert, die aus Phospholipiden freigesetzt wird oder exogen, aus dem Plasma aufgenommen wird.

Dutta-Roy et al. [45] konnten an humanen Thrombozyten zeigen, dass die TxA₂-Synthese von der Aufnahme freier Arachidonsäure abhängig ist. Es konnte in anderen Studien von Dutta-Roy et al. gezeigt werden, dass CD36 die Aufnahme freier Fettsäure (Ölsäure und Arachidonsäure) in die Thrombozyten vermittelt und in die Arachidonsäure-induzierte Aggregation involviert ist [46]. Bei Untersuchungen an Thrombozyten von Patienten, die am myeloproliferativen Syndrom leiden, wurde eine verstärkte Expression von FAT/CD36 auf der Thrombozytenmembran festgestellt. Damit einhergehend wurde eine gesteigerte Kapazität der Thrombozytenmembran Arachidonsäure zu binden und über die Zellmembran aufzunehmen beobachtet [123].

Thrombozyten von CD36-defizienten Individuen exprimieren kein CD36. Untersuchungen, die an CD36-defizienten Thrombozyten durchgeführt wurden, ergaben eine verminderte Arachidonsäurekonzentration in den Zellen und eine verringerte Aggregationshemmung durch Arachidonsäure, die CD36-vermittelt ist [80].

Phosphorylierung von FAT/CD36 in humanen Thrombozyten

Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiger Regulationsmechanismus vieler Zellfunktionen. In humanen Thrombozyten konnte nachgewiesen werden, dass die Rezeptorfunktionen von CD36 durch Phosphorylierung während der Synthese und der Translokation zur Zellmembran reguliert werden. Die Ergebnisse von Asch et al. [15] an humanen Thrombozyten zeigen, dass das Bindungsverhalten des CD36 zu den Liganden Thrombospondin und Kollagen durch Phosphorylierung des Thr91 verändert wird. Die veränderte Bindung dieser Liganden beeinflusst die Aktivität und den Stoffwechsel der Thrombozyten.

In der äußeren Zellmembran humaner Thrombozyten beschrieben Hatmi et al. [72] in ihren Untersuchungen eine Ekto-Proteinkinase A und identifizierten CD36 als das hauptsächliche Substrat dieser Phosphorylierung. Guthmann et al. zeigten, dass der Phosphorylierungsstatus von CD36 die Fettsäureaufnahme von humanen Thrombozyten reguliert [64]. Die in den Untersuchungen nachgewiesene cAMP-abhängige (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat)

Ektophosphorylierung von CD36 senkte die Palmitinsäureaufnahme von intakten humanen Thrombozyten auf 72 %. Die Beispiele machen deutlich, dass wichtige Funktionen von CD36, vor allem der Fettsäuretransport langkettiger Fettsäuren, durch Phosphorylierung reguliert werden können.

Die Regulation der Fettsäureaufnahme durch Phosphorylierung des Membranproteins FAT/CD36 und bot daher einen hochinteressanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen der zellulären Steuerung der Fettsäureaufnahme. Thrombozyten sind dabei ein gutes Modell für die Darstellung von Signaltransduktionswegen, da sie CD36 stark exprimieren und Thrombozyten gut reproduzierbar isoliert werden können.

2 Fragestellung

Das Membranprotein FAT/CD36 ist an der Aufnahme exogener langkettiger Fettsäuren über die Zellmembran beteiligt. An humanen Thrombozyten wurde die Beteiligung von FAT/CD36 am Fettsäuretransport (Ölsäure und Arachidonsäure) beschrieben, ohne allerdings die Regulation der Fettsäureaufnahme zu untersuchen [45, 46]. CD36 kann offensichtlich intrazellulär, Proteinkinase C-vermittelt an seinem Thr91 und extrazellulär, cAMP-abhängig phosphoryliert werden. Es wurde gezeigt, dass das Bindungsverhalten humaner Thrombozyten vom PKC-vermittelten Phosphorylierungsstatus des FAT/CD36 abhängt [15], während die cAMP-abhängige Ekto-Phosphorylierung von CD36 die Palmitinsäureaufnahme hemmt [64]. Mit der vorliegenden Arbeit wollten wir untersuchen, ob die intrazelluläre Phosphorylierung des CD36 die Fettsäureaufnahme beeinflusst. Für die Experimente wählten wir Thrombozyten, da hier die meisten Vorbefunde erhoben wurden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Radioaktive Substanzen:

[9,10(n)³H]-Palmitinsäure, 37 MBq/ml (a)

[P³²] H₂PO₄ , 2 MBq/μl (b)

Antikörper:

Anti-Protein Kinase C_{αβ}, Anti-PKC_{αβ}

Rabbit pAb Rabbit pAb, (c)

Anti-Maus IgG (F_{ab}-spezifisch) Peroxidase-Konjugat, (e)

Acrylamid/Bisacrylamid 37,5 : 1 (40 % (w/v)), (d)

Ammoniumperoxydisulfat, (e)

Bromphenolblau, (e)

8-Bromo-cAMP, (e)

cAMP, Natriumsalz, (e)

Chelerythrine, (e)

CeliteTM, (f)

Chemolumineszenz Blotting Substrat (POD), (g)

D-(+)-Glukose, (e)

Forskolin, (c)

Genistein, (e)

Glycerin, (e)

Heparin, LiqueminTM N 25000, (h)

Milchpulver "Glücksklee", (i)

NaCl 0,9 %, (j)

Natriumlaurylsulfat (SDS), (e)

Nitrozellulose-Transfermembran, (k)

Okadaic Acid, (e)

Palmitinsäure (1 mg/ml Methanol (wt/v)), (l)

Para-Nitrophenylphosphat (PNPP), Dinatrium-Hexahydrat, (c)

Pierce SuperSignal Chemolumineszenz-Substrat, (m)

PMA, Phorbol 12-myristate 13-acetate, (e)

Ponceau S, (e)

Prostaglandin I₂ in (Glycinpuffer) FlolanTM, (n)

Protease-Inhibitions-Cocktail-Tabletten "PIC Mini", EDTA-frei, (g)

Pyridoxal-Phosphat-6-azophenyl-29, 49-disulfonische Säure (PPADS), (e)

Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V, (o)

Rinderserumalbumin Fraktion V, (p)

Scintillationsflüssigkeit OptiPhase HI-Safe 3, (q)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyläthylenamin), (d)

Terbutalin, Bricanyl Lösung, (s)

Tris-Hydromethylaminomethan (Tris-Base), (e)

TweenTM 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), (e)

Vanadat, Orthovanadate, (c)

- a Amersham Biosciences, Freiburg
- b Hartmann Analytic, Braunschweig
- c Calbiochem, Bad Soden
- d Serva Electrophoresis, Heidelberg
- e Sigma, Steinheim
- f Supelco, Bellefonte, PA, USA
- g Roche Diagnostics, Mannheim
- h Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
- i Nestlé, Frankfurt am Main
- j Braun, Melsungen
- k Schleicher und Schuell, Dassel
- l Ferak, Berlin
- m Perbio Science, Bonn
- n Glaxo Wellcome, Oxford, England
- o Biomol Feinchemikalien, Hamburg
- p Boehringer Mannheim
- q Wallac, Loughborough, England
- r AstraZeneca/pharma-stern, Wedel

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien haben den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.a.).

3.2 Geräte und Hilfsmittel

- für die Radioaktivitätsmessung: Liquid Scintillation Counter 1410, Perkin Elmer Wallac, Freiburg
- für die Ultrazentrifugation: Ultrazentrifuge L 7-65 mit den Rotoren SW-65 und 42.2 TI, Beckmann, Krefeld
- für die SDS-PAGE: Gelgießkammer SE 200 Mighty Small, Hoefer, Holliston, USA und Elektrophorese-Apparatur Phero-vert, Biotec Fischer, Reiskirchen
- für den Nitrocellulosemembrantransfer per Semi-Dry-Blotting-Verfahren: Semi-Dry-Blotter Pegasus, Phase GmbH, Lübeck

- für den Westernblot: Wippvorrichtung Red Rocker, Hoefler, USA
- N2-Trockenvorrichtung: Dri-Bloc DB 3, Techne, Sigma-Aldrich, Steinheim
- für die Isolierung humaner Thrombozyten: Wasserbad, Janke & Kunkel, Blutentnahmesystem „Multifly“-Set und S-Monovetten neutral, Sarstedt AG, Nürnberg
- für die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten: Cyclopore™ Track Etched Membrane Porengröße 1 µm, Whatman International, Maidstone, England
- für die Autoradiografie: Röntgenfilm BioMax-MR-1 in Kodak X-Omatic Cassette, Kodak Eastman, Rochester, NY

3.3 Methoden

3.3.1 Isolierung humaner Thrombozyten

Humane Thrombozyten werden aus dem Armvenenblut gesunder, weiblicher und männlicher Probanden gewonnen, die in den vorausgegangenen 14 Tagen keine Medikation erhalten hatten. Wir isolierten die Thrombozyten nach einer Standardmethode [107], die von Guthmann et al. [64] durch die Verwendung von Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) anstatt Apyrase zur Aggregationshemmung, modifiziert wurde.

Reagenzien:

Antikoagulans Acid-Citrate-Dextrose (ACD):

Na ₃ H ₂ - Citrat	27,4 g/l	7 mM
Citrat - H ₂ O	14,8 g/l	93 mM
Glukose	25,0 g/l	139 mM
Heparin	20,0 U/ml	
in aqua dest., pH 4,5		

Tyrode-Waschpuffer:

NaCl	8 g/l	137 mM
KCl	0,2 g/l	2,7 mM
NaHCO ₃	1 g/l	11,9 mM
NaH ₂ PO ₄	0,05 g/l	0,3 mM
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	0,203 g/l	1 mM
CaCl ₂ • 6 H ₂ O	0,438 g/l	2 mM

Glukose	1 g/l	5,6 mM
BSA (fettsäurefrei)	3,5 g/l	0,35 % (w/v)
PGI ₂		1 nM
in aqua dest., pH 7,35		

Tyrode- Resuspensionspuffer:

Entspricht dem Tyrode-Waschpuffer, aber ohne PGI₂ und ohne BSA (Rinderserum-Albumin). Auf das „Schutzprotein“ Albumin wird verzichtet, da es die Messung der Fettsäure-Aufnahme beeinflussen würde. Der Tyrode-Resuspensionspuffer wird im Folgenden als „Tyrode-Puffer“ bezeichnet.

Durchführung:

Dem nüchternen Spender wurden in vier 9 ml-Monovetten insgesamt 31 ml Armvenenblut entnommen. Das Antikoagulans (ACD) war in den Monovetten bereits im Verhältnis ACD:Blut 1:6 (v/v) vorgelegt. Blut und Puffer wurden während der gesamten Präparation auf einer Temperatur von 37 °C gehalten. Nach Zentrifugation des Blut-ACD-Gemisches (190 x g, 15 min) wurden im Mittel 10 ml plättchenreiches Plasma (PRP) mit Kunststoffpipetten in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Erythrozytensediment und „buffy-coat“ wurden verworfen, um die Verunreinigung der Thrombozyten mit Leukozyten zu minimieren. Nach Zentrifugation des PRP (2500 x g, 15 min) wurde der Überstand an plättchenarmem Plasma (PPP) verworfen. Das Thrombozytensediment wurde in 25 ml Waschpuffer mit Zusatz von 50 U/ml Heparin vorsichtig mit Hilfe einer Kunststoffpipette resuspendiert. Die Thrombozytensuspension wurde 15 min ruhen gelassen, anschließend für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert und durch Resuspension in 25 ml Waschpuffer erneut gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (1200 x g, 15 min) wurden die Thrombozyten in 5 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Um eventuell entstandene Thrombozytenaggregate abzutrennen, wurde die Suspension vor der Bestimmung der Zellzahl noch einmal zentrifugiert (60 x g, 1 min). Der Überstand dieser letzten Zentrifugation wurde für die Durchführung der Experimente verwendet, die Thrombozyten-Konzentration der Lösung wurde im Routine-Labor* gemessen und mit Resuspensionspuffer auf $2,5 \cdot 10^8$ Thr./ml eingestellt.

* Die Zellzählung erfolgte im Routinelabor der Charité, Campus Mitte mit einem Gerät vom Typ Bayer Technicon H 3 RTX.

3.3.2 Palmitinsäureaufnahmeexperimente humaner Thrombozyten

Die Experimente zur Bestimmung der Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten wurden, wie von Guthmann et al. [64] beschrieben, durchgeführt.

Reagenzien:

Thrombozytensuspension: wie in Kap.2.3.1 beschrieben

Stop-Lösung:

BSA	10,0 g/l	1 % (w/v)
in NaCl		0,9 % (w/v)
Szintillationsflüssigkeit:	(Optiphase HI-Safe 2, Wallac)	

[³H]-Palmitinsäure-Lösung:

Palmitinsäure	(1 mg/ml Methanol (wt/v))
[³ H]-markierte Palmitinsäure	(37 MBq/ml Methanol (act/v))
Bovines Serum Albumin	(Fraktion V, fettsäurefrei)
Bovines Serum Albumin	

Ansatz der [³H]-Palmitinsäure-Lösung:

Der Ansatz der [³H]-Palmitinsäure-Lösung mit einer definierten Konzentration freier Fettsäure erfolgte wie von Guthmann et al. [63] beschrieben. 11,2 µl Palmitinsäure und 2,8 µl [³H]-markierte Palmitinsäure wurden mit einer Spatelspitze CeliteTM versetzt und unter N₂ getrocknet. Nach Zugabe von 900 µl Tyrode und 100 µl BSA (Fraktion V, fettsäurefrei) erfolgte unter ständigem Rühren bei 37 °C über 1 Stunde die Äquilibration des Ansatzes. Anschließend wurde das Volumen auf 10 ml mit Tyrode-Puffer eingestellt. Zur Entfernung des CeliteTM wurde die Lösung zweifach zentrifugiert (1000 x g, 5 min) und abschließend durch einen 0,2 µm-Filter gefiltert. Die hier angegebenen Mengen ergaben eine Lösung mit 5,1 nM freier Palmitinsäure, berechnet nach Richieri et al. [119]. Durch Änderung des Verhältnisses von Palmitinsäure zu BSA (PA:BSA = 0,4 bis 5,0) wurden Lösungen 5,1 nM bis 808 nM freier Palmitinsäure hergestellt.

Reagenzien für die Palmitinsäureaufnahmeexperimente:

Alle Reagenzien wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn von der Stammlösung auf die benötigte Konzentration mit Tyrode-Puffer verdünnt.

Substanzen	Tyrode-Pufferlösung	Stammlösung
PMA	1 μ M	1 mM in DMSO
Chelerythrine	1 μ M	10 mM in DMSO
Genistein	150 μ M	10 mM in DMSO
Forskolin	10 μ M	100 mM in DMSO
Okadaic Acid	0,003 nM–300 nM	30 μ M in EtOH
Terbutalin	10 μ M	100 mM in Tyrode-Puffer
8-Bromo-cAMP	5 μ M	5 mM in Tyrode-Puffer
Vanadat	5 μ M	10 mM in Tyrode-Puffer

Durchführung:

Die Thrombozytensuspension wurde in 10 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, so dass sich in jedem Gefäß $0,5 \times 10^8$ Thrombozyten in 200 μ l Tyrode-Puffer befanden. Die Gefäße standen im Wasserbad bei 37 °C, durch regelmäßiges Aufschütteln wurde das Sedimentieren der Thrombozyten verhindert. Den Thrombozyten wurden die Substanzen (ebenfalls in Tyrode-Puffer gelöst) zugegeben, deren Effekt auf die Palmitinsäureaufnahme gemessen werden sollte. Jeder Ansatz wurde mit Tyrode-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 300 μ l aufgefüllt. Dem Ansatz wurde 300 μ l [3 H]-markierte Palmitinsäure-Lösung zugeführt, durch leichtes Schütteln unter die Thrombozyten gemischt und für 20 Sekunden zusammen inkubiert. Anschließend wurde 2,5 ml eiskalte Stopp-Lösung zugegeben und das gesamte Volumen unverzüglich durch den Polycarbonatfilter gefiltert. Reaktionsgefäß und Apparatur wurden mit insgesamt 7,5 ml Stopp-Lösung nachgespült. Der obere Plexiglaszylinder wurde abgehoben, der Filter mit einer Pinzette in ein Zählröhrchen überführt und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Apparatur und Pinzette wurden mit aqua dest. gespült und ein neuer Filter eingelegt. Nach 1 h Standzeit zur Lösung der Thrombozyten vom Filter wurde gründlich gemischt und anschließend die [3 H]-Messung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer vorgenommen.

3.3.2.1 Berechnung der Palmitinsäureaufnahme

Die Bestimmung der Palmitinsäureaufnahme wurde nach folgender Formel berechnet:

$$U = (D - D_0) \cdot v^{-1} \cdot f$$

U = Palmitinsäureaufnahme (pmol / 10^8 Thrombozyten)

D = Zählrate der Probe (dpm)

D_0 = Zählrate des Leerwertes (dpm)

v = spezifische Aktivität der [^3H]-Palmitinsäurelösung (dpm / pmol)

f = Normierungsfaktor (10^8 Zellen / Zellzahl in der Probe)

Bestimmung von Leerwert und Kontrollwert:

In jedem Experiment wurde zur Bestimmung des „Leerwerts“ Tyrode-Puffer in einem Ansatz ohne Thrombozyten mit [^3H]-Palmitinsäure „inkubiert“. Die Aktivität, die durch Adhäsion von [^3H]-Palmitinsäure am Filter gemessen wurde, wurde bei der Berechnung der Palmitinsäureaufnahme der Thrombozyten abgezogen. Wir verzichteten auf die zusätzliche Bestimmung eines „Blankwertes“ (Ansatz mit Thrombozyten, 0 s Inkubationszeit mit [^3H]-Palmitinsäure), da er im Verhältnis zur anschließenden Palmitinsäureaufnahme in Vorversuchen zu vernachlässigen war.

In jedem Experiment wurden zur Bestimmung eines „Kontrollwerts“ Thrombozyten nach der Isolation ohne weitere Zusätze im Tyrode-Medium inkubiert. Ihre Palmitinsäureaufnahme wurde für die jeweilige Thrombozyten-Präparation gleich 100 % definiert. Die in einem unabhängigen Experiment gemessenen Effekte verschiedener Inkubationsbedingungen auf die Palmitinsäureaufnahme wurden in Relation zu dem jeweiligen Kontrollwert als „% der Kontrolle“ ausgedrückt.

3.3.3 Präparation der Thrombozytenmembran

Um einen sicheren Unterschied von membranständigen und zytosolischen Proteinen für den autoradiografischen und immunologischen Nachweis machen zu können, wurde eine Membranpräparation der Thrombozyten durchgeführt.

Reagenzien:

Thrombozytensuspension:	wie in Kap.2.3.1 beschrieben
Homogenisationspuffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 250 mM Saccharose 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM Dithiothreitol 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 1 µg / ml Pepstatin 10 µg / ml Aprotinin 10 µg / ml Leupeptin 1 Boehringer Proteinaseinhibitortablette/10 ml
doppelt konzentrierte SDS-PAGE-Auftragspuffer:	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % SDS 20 % Glycerol 75 mM DTT Bromphenolblau ad libitum

Durchführung:

Die Thrombozytensuspension, wie in Kap. 2.3.1 beschrieben, wurde auf mehrere Ansätze verteilt und nach Zusatz und zeitgemäßer Inkubation der jeweiligen Bedingung wurde der Überstand mittels Zentrifugation (1min, 14000 rpm) entfernt. Die Zellen wurden anschließend pro Ansatz in 300 µl Homogenisationspuffer aufgenommen und durch Ultraschall (8 US-Stöße á 1s mit 200 W bei 4 °C) lysiert. Die Hälfte (150 µl) des erhaltenen Zelllysats wurde mit gleicher Menge Auftragspuffer versetzt, die anderen 150 µl wurden bei 100.000 g, 4 °C über 1h ultrazentrifugiert. Die danach erhaltene Zytosolfraktion (Überstand) wurde mit 150 µl Auftragspuffer versetzt und das Membranpellet wurde in 300 µl Auftragspuffer über 1h bei 4 °C aufgenommen. Mittels dieser Methode erhielt man drei Fraktionen (Zelllysate, Zytosol- und Membranfraktion) gleichen Volumens und gleicher Zellzahl. Nach Berechnung der Zellzahl/µl wurden Zytosolfractionen, Membranfraktionen und Zelllysate von 50 bzw. 80 Mio Thrombozyten (je nach Experiment) für die SDS-PAGE aufgetragen.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der eindimensionalen SDS-Page nach Laemmli et al. [90] werden die Proteine einer Probe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Beim Erhitzen im mercaptoethanolhaltigen Auftragspuffer werden die Polypeptide hitzedenaturiert, d.h. die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine geht verloren. Durch den Zusatz von SDS wird die Ladung des Proteins abgeschirmt indem anionische Micellen mit konstanter Nettoladung pro Masseinheit entstehen. Durch diese Behandlung entsteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts eines Proteins und seiner Wanderungstrecke im Polyacrylamidgel. Mit Hilfe von Markerproteinen von definierter Molekülmasse lassen sich die Molekulargewichte der Moleküle bestimmen. Der Name „diskontinuierliche SDS-PAGE“ bezieht sich auf die Verwendung eines Sammelgels mit großer Polyacrylamid-Porenweite (5 %) vor dem eigentlichen Trenngel. Die im Sammelpuffer enthaltenen Chlorid-Ionen wandern schneller als die zu trennenden Proteine, während im Elektrophoresepuffer Glycin-Ionen vorherrschen, die langsamer als die Proteine wandern. Zwischen den Chlorid-Ionen und den Proteinen entsteht im Resultat eine Zone geringer Leitungsfähigkeit und somit ein größerer Spannungsgradient. Die dadurch erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit bewirkt eine Fokussierung der Proteine in einer scharfen Bande beim Eintritt ins Trenngel.

Reagenzien:

Stammlösungen:	(A)	Acryl/Bisacrylamid	30 % / 0,8 % (wt/v)
	(B)	Tris/HCL-Puffer (Sammelgel)	0,5 M, pH 6,8
	(C)	Tris/HCL-Puffer (Trenngel)	1,5 M, pH 8,8
	(D)	SDS	10 % (wt/v)
	(E)	TEMED	
	(F)	Ammoniumperoxidsulfat	10 % (wt/v)
8 % Trenngel:	(A)	6000 µl	
	(C)	7500 µl	
	(D)	300 µl	
	(E)	20 µl	
	(F)	300 µl	ad 30 ml aqua dest.

4,5 % Sammelgel:	(A)	1126 μ l	
	(B)	2500 μ l	
	(D)	100 μ l	
	(E)	6 μ l	
	(F)	100 μ l	ad 10 ml aqua dest.

doppelt konzentrierte SDS-PAGE-Auftragspuffer:	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	2% SDS
	20 % Glycerol
	75 mM DTT
	Bromphenolblau ad libitum

Elektrophoresepuffer:	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (wt/v)

Durchführung:

Für die Elektrophorese wurde eine Kammer mit einer Gelgröße von 180 * 150 * 1 mm verwendet. Zunächst wurden ca. 20 ml Trenngel in die Kammer gegossen, das Trenngel mit ca. 100 μ l aqua dest. überschichtet und die Polymerisation des Gels abgewartet. Nach Abgießen des überschüssigen aqua dest. wurden ca. 7,5 ml Sammelgel in die Kammer gefüllt und der Probenkamm mit zehn Vertiefungen eingesetzt. Während des gesamten Gießvorganges war die Oberseite der Gießkammer stets feucht zu halten. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde die Kammer in die Elektrophorese-Apparatur gestellt, mit Elektrophoresepuffer bedeckt und der Kamm entfernt. Die mit Probenpuffer versetzten Proteinlösungen und der Proteinstandard wurden für drei Minuten im Thermomixer auf 95 °C erhitzt und daraufhin je nach Versuchsanordnung 10 – 60 μ l der Proben in die Geltaschen transferiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 30 mA (max. 250 V) etwa 1 h pro Gel.

3.3.5 2D-Gelelektrophorese

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese werden Proteine in einem Polyacrylamidgel mit einem geeigneten Puffer mittels eines pH-Gradienten in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei nutzt man zwei Eigenschaften von Proteinen: Ladung und Masse. Proteine sind geladene Moleküle, deren Ladung je nach Aminosäurezusammensetzung variiert. Die Nettoladung des Proteins ändert sich, wenn der pH-Wert der Umgebung geändert wird. Der pH-Wert, an dem sich die positiven und negativen Ladungen eines Proteins aufheben und die Nettoladung Null beträgt, nennt man isoelektrischen Punkt (pI). Bei einem pH-Wert, der dem pI-Wert entspricht, wandert ein Protein in einem elektrischen Feld nicht mehr, da es keine Ladung mehr aufweist. Da jedes Protein einen charakteristischen isoelektrischen Punkt besitzt, kann man ein Proteingemisch in einem pH-Gradienten mit Hilfe eines elektrischen Feldes auftrennen (Isoelektrische Fokussierung). Bei der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension) und anschließend nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (2. Dimension). Peptide mit geringem Molekulargewicht wandern schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels und daher weiter als große Proteine. Auf diese Weise können in hochauflösenden 2D-Gelen bis zu 10.000 verschiedene Proteine aufgetrennt werden. Nach der Auftrennung werden die Proteine im Gel mit speziellen Färbeverfahren sichtbar gemacht.

Durchführung und Reagenzien:

Die Durchführung der 2D-Elektrophorese und der vorausgehenden Gesamteiweißbestimmung mit Zellsolubilisierung erfolgte in Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Universitätsklinikum Charité.

Reagenzien:

Für die Zellsolubilisierung:

7 M Urea
2 M Thioharnstoff
4 % CHAPS
20 mM Spermin
40mM DTT

Für die Gesamteiweißbestimmung:

Lysepuffer für die Eichkurvenherstellung
0,1 M HCL
20% TCA

Für die 1. Dimension: Immobiline Polyacrylamidgel (3 meq x L⁻¹ x pH⁻¹, 3,75 % T; 4 % C); pH 4-7 (Pharmacia, 7 cm),

Für die 2. Dimension: wie in Kapitel 1.3.4 beschrieben

Durchführung:

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden zunächst die Proben in der o.g. Lösung solubilisiert, zentrifugiert (105000 g, 1 h) und mit dem Pharmalyte 3-10 (2D-Probenpuffer) versetzt. Die darauffolgende Proteinbestimmung erfolgte mit der TCA Methode. Die Proteinmenge pro Probe wurde bei 20 µg festgelegt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei 44,8 mA/Gel (0,8 mA/cm²) für 1h. Die Gelstreifen wurden anschließend an ein Polyacrylamidgel gelegt es erfolgte die oben beschriebene SDS-Gelelektrophorese in einer Novex XCELL Elektrophorese-Einheit (Invitrogen) im Elektrophoresepuffer.

3.3.6 Westernblot

Das Verfahren des „Western Blotting“ wird zum Nachweis eines bestimmten Proteins innerhalb einer Proteinmischung verwendet. Hierzu wird die Probe zunächst mittels der diskontinuierlichen SDS-PAGE (siehe auch 2.3.4.) aufgetrennt und im Semi-Dry-Blotverfahren elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, so dass die Proteine darauf im gleichen Muster wie auf dem Gel immobilisiert sind. Optional erfolgt dann die reversible Färbung mit Ponceau S zur Kontrolle der Transfereffizienz. Danach erfolgt das „Blocken“ in 5 % Magermilchpulver (MMP) in TBSt (5 % wt/v) zur Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen der Membran und zum Verhindern unspezifischer Antikörperbindung. Schließlich wird die Folie mit einer Lösung des ersten Antikörpers (monoklonaler Antikörper oder Hyperimmunserum) inkubiert, der spezifisch an das gesuchte Protein bindet. Danach wird die Folie zur Entfernung überschüssiger freier Antikörper und mit dem zweiten Antikörper inkubiert, der gegen konstante Anteile des ersten Antikörpers gerichtet ist. Zur Visualisierung ist dieser mit einem Enzym (zum Beispiel Meerrettichperoxidase) gekoppelt, das durch Umsetzen eines Substrats ein Chemilumineszenz-Signal erzeugt, welches durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird. Die Größe und Dichte der entstandenen Bande lässt Rückschlüsse auf die Menge des Proteins auf der Folie zu.

Reagenzien:

Kathodenpuffer:	0,025 M Tris-Base, 0,040 M ϵ -Aminocapronsäure /20 % Methanol (v/v)
Anode-I-Puffer:	0,03 M Tris-Base / 20 % Methanol (v/v)
Anode-II-Puffer:	0,3 M Tris-Base / 20 % Methanol (v/v)
TBS-t:	Tris-Base 50 mM NaCl 150 mM Tween 20 0,1 % (v/v)
unspezifische Blockier-Lösungen:	Boehringer blocking substrate 1 % (v/v) Magermilchpulver 5 % (w/v) in TBS-t

Durchführung:

Unmittelbar nach Ende der Elektrophorese wurden die Proben im Semi-Dry-Blottingverfahren 70 min bei $2,5 \text{ mA/cm}^2$ (die zweidimensionalen Blots bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$) horizontal auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Die eindimensionalen Blots wurden danach mit Ponceau S reversibel angefärbt. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in 5 % Magermilchpulver in TBS-t (wt/v) geblockt. Nach dem Blocken erfolgte dreimaliges Spülen mit TBS-t über 10 min und die Inkubation mit dem jeweiligen ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 100 bis 1 : 1000 (5 % MMP / TBS-t (wt/v) bzw. Blotting-Reagent) über 1-2 h. Hierauf folgte wieder ein dreimaliger Spülvorgang, dann die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Horse-Radish-Peroxidase) in einer Verdünnung von 1: 1.000 bis 1: 2.000 (5 % MMP / TBS-t bzw. Blotting Reagent) für 1 Stunde mit anschließendem (oben beschriebenen) dreimaligen Spülvorgang. Danach wurden die nun antikörper-markierten Proteine mittels Pierce SuperSignal Chemoluminiszenz-Substrat photographisch sichtbar gemacht.

3.3.7 Autoradiographie

Die Autoradiographie dient dem Nachweis der Phosphorylierung thrombozytärer Proteine.

Reagenzien:

[P³²] H₂PO₄ (2 MBq/μl)

Thrombozytensuspension: wie in Kap. 2.3.1 beschrieben

Homogenisationspuffer: wie in Kap. 2.3.3 beschrieben

doppelt konzentrierte SDS-PAGE-Auftragspuffer: wie in Kap. 2.3.3 beschrieben

Durchführung:

Der Thrombozytensuspension, wie in Kap. 2.3.1 beschrieben, wurde die [P³²] H₂PO₄ zugegeben und bei 37° C im Wasserbad 2 h lang unter leichter Schüttelbewegung inkubiert.

Dem danach folgenden Zusatz und der zeitgemäßen Inkubation der jeweiligen Bedingung wurde der Überstand mittels Zentrifugation (1 min, 14000 rpm) entfernt. Die Zellen wurden anschließend pro Ansatz in 400 μl Homogenisationspuffer aufgenommen und durch Ultraschall (8 US-Stöße á 1s mit 200 W bei 4 °C) lysiert. Die Hälfte (200 μl) des erhaltenen Zelllysats wurde nun mit gleicher Menge Auftragspuffer versetzt, die anderen 200 μl wurden bei 100.000 g, 4 °C über 1 h ultrazentrifugiert. Die danach erhaltene Zytosolfraktion (Überstand) wurde mit 200 μl Auftragspuffer versetzt und das Membranpellet wurde in 400 μl Auftragspuffer über 1 h bei 4 °C aufgenommen. Mittels dieser Methode erhielt man drei Fraktionen (Zelllysats, Zytosol- und Membranfraktion) gleichen Volumens und gleicher Zellzahl. Nach Berechnung der Zellzahl/μl wurden Zytosolfractionen, Membranfraktionen und Zelllysats von 50 bzw. 80 Mio. Thrombozyten (je nach Experiment) für die SDS-PAGE aufgetragen bzw. 20 μg Proteingehalt pro 2D-Gel. Die Proteine wurden dabei getrennt und im Semidry-Blotting-Verfahren auf Nitrozellulosefolie übertragen. Der getrocknete Blot wurde in der Dunkelkammer auf einen Kodak Biomax-MR-1-Film gelegt, der nach 4-8 Tagen Belichtungszeit (-20 °C) entwickelt wurde.

3.3.8 Einsatz von Radiochemikalien

Das Lipidlabor der Klinik für Neonatologie am Campus Charité Mitte verfügt über die Erlaubnis des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin zur Arbeit mit Radiochemikalien (Genehmigungsbescheid U 1367/92 vom 30.07.1992). Die genehmigte Bezugsaktivität beträgt jährlich 400 MBq [³²P] und 1000 MBq [³H].

3.3.9 Statistik

Bei den angegebenen Messwerten handelt es sich um den Mittelwert von Dreifachbestimmungen aus einer Thrombozytenpräparation. Sofern nicht anders ausgewiesen, wurden die Ergebnisse in drei unabhängigen Experimenten reproduziert ($n = 3$). Es wird der Mittelwert (Mw.) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem Students-t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$. Für die Grafiken und statistischen Berechnungen wurden die Programme GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und Excel 2000 (Microsoft Corporation) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Präparation humaner Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden nach der Methode von Mustard et al. [107], die von uns modifiziert wurde [64], präpariert. Das für die Thrombozytenpräparation benötigte Vollblut wurde je nach Versuchsaufbau in verschiedenen Mengen abgenommen. Ausbeute und Reinheit der so gewonnenen Thrombozytenpräparationen aus verschiedenen Blutvolumina sind in Tabelle 1 dargestellt. Unabhängig von der Präparationsgröße konnten 53 bis 59 % der ursprünglich vorhandenen Thrombozyten isoliert werden. Die Präparationen waren maximal mit 125/100.000 Leukozyten und 30/100.000 Erythrozyten verunreinigt. Die Methode war für unsere Zwecke ausreichend reproduzierbar und effizient.

Tab. 1 Thrombozytenpräparationen

	Mw (SD)			
Vollblut (ml)	15,5	23,3	31,0	38,8
Anzahl (n)	12	7	4	4
Ausbeute (GPlt)	2,37 (0,93)	3,55 (0,99)	4,24 (1,75)	6,74 (0,75)
Ausbeute (%)	57,8 (8,4)	58,6 (12,6)	53 (15)	57 (7,4)
Leukozyten (‰)	0,64 (0,7)	0,38 (0,5)	1,25 (1,7)	0,38 (0,1)
Erythrozyten (‰)	0,3	0	0,1	0,1

GPlt = 10^9 Thrombozyten; Mw = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Die Verunreinigung der Präparationen mit Leukozyten und Erythrozyten wurde auf die Thrombozytenzahl in der Suspension bezogen.

4.2 Palmitinsäureaufnahme von humanen Thrombozyten

Zur Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der Palmitinsäureaufnahme wurden ruhende Thrombozyten für 20 s mit [³H]-markierter Palmitinsäure inkubiert. Die Konzentration freier Fettsäure wurde nach Richieri et al. [119] berechnet und betrug 5,1 nM bis 808 nM. In der Literatur wird der Mechanismus der Fettsäureaufnahme kontrovers diskutiert. Sowohl für den passiven [67] als auch für den aktiven Fettsäuretransport [2] sind experimentelle Daten publiziert. Wir wählten deshalb für die Analyse unserer Daten ein kombiniertes Modell, das beide Komponenten der Fettsäureaufnahme berücksichtigt.

Die unterbrochene Linie in den Abbildungen 2a und 2b beschreibt eine nichtlineare, sättigbare Funktion unserer gemessenen Werte, unter Annahme eines sättigbaren und eines nicht-sättigbaren Anteils am Palmitinsäuretransport.

Die Regressionsanalyse beruht auf folgenden Gleichungen:

Sättigbarer Anteil unter Annahme einer einseitigen Bindung

$$y = V_{\max} * x / (K_m + x)$$

Nicht-sättigbarer (linearer) Anteil

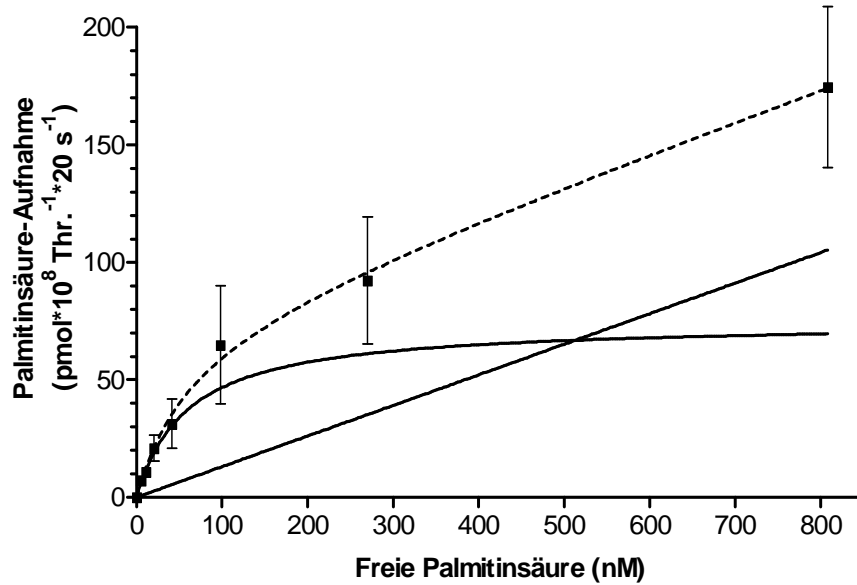
$$y = zx + s$$

Die Regressionsanalyse berücksichtigt beide Anteile und wurde nach der Funktion

$$y = [V_{\max} * x / (K_d + X)] + [zx + s]$$

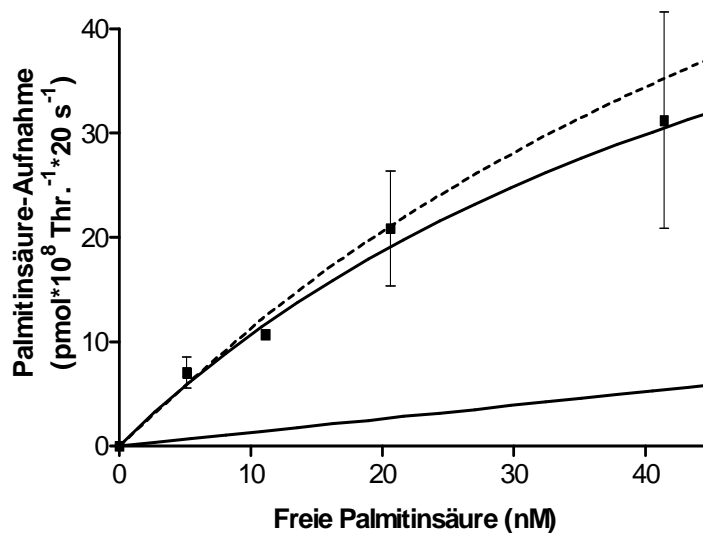
berechnet. Der Regressionskoeffizient r betrug 0,97.

Abb. 2a Konzentrationsabhängigkeit der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten



Initiale Palmitinsäureaufnahme ($\text{pmol} \times 10^8 \text{Thr.}^{-1} \times 20 \text{s}^{-1}$) als Mittelwert \pm SD in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration freier Palmitinsäure, $n = 3$. Die unterbrochene Linie zeigt die nonlineare Regression berechnet nach der Formel: $y = [V_{\text{max}} * x / (Kd + X)] + [zx + s]$ (GraphPad Prism 3.0). Die durchgezogenen Kurven stellen nur die berechnete sättigbare bzw. nur die lineare Komponente der Regressionskurve dar.

Abb. 2b Konzentrationsabhängigkeit der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten (Ausschnitt)



Vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 2a, extrazelluläre Konzentration freier Palmitinsäure bis 42 nM.

Da eine Konzentration von 5,1 nM freier Palmitinsäure den physiologischen Bedingungen ($7,5 \pm 2,5$ nM) am nächsten kommt [Richieri 1995] und dabei die passive Diffusion vernachlässigbar klein ist, wählten wir für die folgenden Experimente diese Konzentration der freien Fettsäure als Standard. Wir entschieden uns für folgende Standardbedingungen: $0,5 \times 10^8$ Thrombozyten wurden für 20 s mit 5,1 nM freier Palmitinsäure bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

4.3 Untersuchungen zur Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten

4.3.1 Bestimmung des Kontrollwertes

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die initiale Palmitinsäureaufnahme in den folgenden Experimenten quantifizieren zu können, wurde ein Bezugswert bestimmt. In jeder Versuchsreihe wurde die Palmitinsäureaufnahme an einem Aliquot ruhender humaner Thrombozyten bestimmt, das nach der Präparation ohne weitere Zusätze im Tyrode-Medium inkubiert blieb. Dieser Wert wurde für die jeweilige Versuchsreihe als „Kontrollwert“ gleich 100 % gesetzt. Tabelle 2 zeigt typische Kontrollwerte.

Tab. 2 Kontrollwerte der Palmitinsäureaufnahme

Präparation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Mw. SD
Aufnahme	11,9	8,7	11,5	8,2	8,6	10,7	9,2	8,8	12,8	11,5	12,4	8,2	10,2 1,75

Die Palmitinsäureaufnahme isolierter, ruhender humaner Thrombozyten (in $\text{pmol} \times 10^8 \text{ Thr}^{-1} \times 20 \text{ s}^{-1}$) bei Inkubation mit 5,1 nM freier Palmitinsäure; Mw. = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Der aus diesen Werten kalkulierte Mittelwert \pm SD der Palmitinsäureaufnahme humaner, ruhender Thrombozyten beträgt $10,2 \pm 1,75 \text{ pmol} \times 10^8 \text{ Thr}^{-1} \times 20 \text{ s}^{-1}$ ($n = 12$).

4.3.2 Einfluss des Phosphatase 1 und 2a Inhibitors Okadaic Säure auf die Palmitinsäureaufnahme von Thrombozyten

Um den Einfluss einer möglichen intrazellulären Phosphorylierung auf die Palmitinsäureaufnahme menschlicher Thrombozyten zu untersuchen, wurden ruhende Thrombozyten mit Okadaic Säure, einem potenten Inhibitor von Proteinphosphatase Typ 1 (PP1) und Typ 2a (PP2a), inkubiert. Die Phosphatasen Typ 1 und 2a dephosphorylieren Proteine und greifen in die intrazelluläre Regulation und Aktivität von Zellen ein. Wir wählten die Okadaic Säure - Konzentrationen im Bereich zwischen 0,003 nM bis 300 nM, da der inhibitorische Effekt auf die Phosphatase Typ 1 und 2a in diesem Bereich angegeben wird. Die Ergebnisse (Abb. 3) zeigten eine dosisabhängige ($r^2 = 0,8840$ links; $r^2 = 0,8621$ rechts) Zunahme der Palmitinsäureaufnahme bei steigender Okadaic Säure - Konzentration.

Abb. 3 Palmitinsäureaufnahme in Abhängigkeit von der Okadaic Säure Konzentration

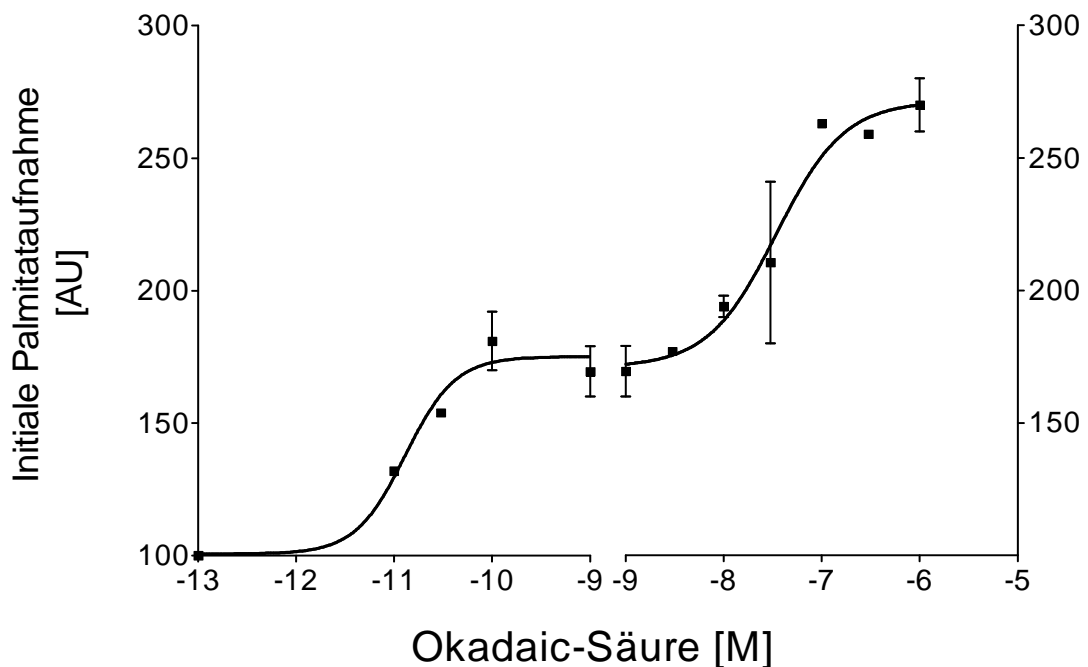


Abb. 3: Initiale Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten (Kontrolle = 100) in Abhängigkeit von der extrazellulären Okadaic Säure-Konzentration (3 pM bis 0,3 μ M), Darstellung von n=3 unabhängigen Versuchen als Mittelwerte \pm SD.

4.3.3 Bedeutung der verschiedenen Proteinphosphorylierungswege für die Palmitinsäureaufnahme

Die Ergebnisse der Inkubation mit Okadaic Säure zeigten, dass der Phosphorylierungsstatus von Proteinen in ruhenden Thrombozyten die Palmitinsäureaufnahme beeinflusst. Es zeigte sich, dass unter Okadaic Säure, als Inhibitor der Proteinphosphatase Typ 1 und 2a, die Aufnahme von Palmitinsäure in die Zelle gesteigert wurde. Es ist bekannt, dass die Proteinphosphatasen PP1 und PP2a über Dephosphorylierung an Ser/Thr-Resten intrazelluläre Proteine regulieren können. Zu diesen Proteinen gehören auch Proteinkinasen, wie Keranen et al [85] und Hansra et al [68] am Beispiel der Proteinkinase C zeigen konnten.

Zur Klärung der Frage, ob und welche Proteinkinasen an der Phosphorylierung der Proteine, die die Palmitinsäureaufnahme vermitteln, beteiligt sind, wählten wir als Inkubationsbedingungen verschiedene Stimulatoren und Inhibitoren von Proteinkinasen.

Im Folgenden sind verschiedene Inkubationsbedingungen aufgelistet, die intrazellulär über Proteinphosphatasen oder Proteinkinasen den Phosphorylierungsstatus von Proteinen beeinflussen. Wir wählten Inhibitoren und Stimulatoren verschiedener intrazellulärer Proteinphosphatasen und Proteinkinasen, um zu untersuchen, ob und ggf. wie sich die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten unter diesen Bedingungen verändert.

Inkubationsbedingungen

Terbutalin

Terbutalin aktiviert als β_2 -Sympathomimetikum indirekt über einen intrazellulären cAMP-Anstieg die Proteinkinase A. Es zeigte sich bei der Inkubation mit 10 μ M Terbutalin für 10 min ein leichter Anstieg der Palmitinsäureaufnahme auf 133 % gegenüber der Kontrolle mit einer Standardabweichung von 26,2 und $p = 0,06$.

8-Bromo-cAMP

Diese Substanz ist ein zellgängiges cAMP-Analogon, das die Proteinkinase A aktiviert. Die Inkubation der Thrombozyten mit 5 μ M 8-Bromo-cAMP für 10 min zeigte mit 119 % gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Effekt ($p > 0,05$).

Forskolin

Forskolin aktiviert die Adenylatcyclase und führt somit zu einer erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentration, wodurch die Proteinkinase A aktiviert wird. Wir beobachteten einen Anstieg der Palmitinsäureaufnahme auf 142 % gegenüber der Kontrolle nach einer Inkubation der Thrombozyten mit 10 μ M Forskolin für 10 min. ($p < 0,05$).

Genistein

Die Inkubation mit Genistein, einem Inhibitor der Protein Tyrosinkinase, hatte keinen Effekt auf die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten. Genistein wurde für 3 min in einer Konzentration von 150 μ M eingesetzt.

Vanadat

Vanadat, ein Inhibitor der Protein Tyrosinphosphatase, stimulierte die Palmitinsäureaufnahme auf 163,8 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Inkubation mit Vanadat erfolgte in einer Konzentration von 5 μ M für 45 min. ($p > 0,05$).

PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)

Bei der Inkubation der Thrombozyten mit PMA, einer Substanz, die die Proteinkinase C aktiviert, zeigte sich von allen Bedingungen der deutlichste Effekt auf die Palmitinsäureaufnahme. PMA wurde in allen Experimenten in einer extrazellulären Konzentration von 1 μ M eingesetzt und für 10 min mit den Thrombozyten inkubiert. Der 2,54-fache Anstieg ($SD=0,38$) der Palmitinsäureaufnahme unter PMA gegenüber der Kontrolle war hochsignifikant ($p = 0,0001$).

Die Abb. 4 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse der Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen.

Abb. 4 Experimente zur initialen Palmitinsäureaufnahme

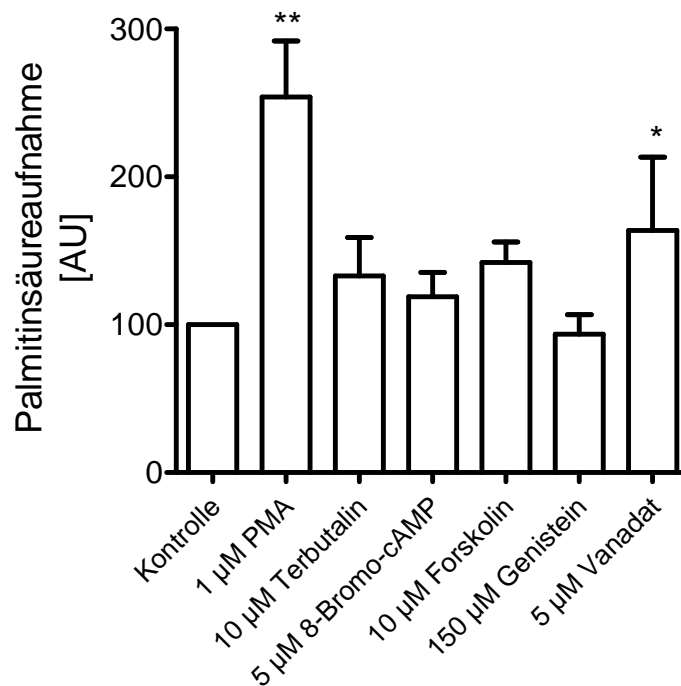


Abb. 4: Darstellung der Mittelwerte der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen (Kontrolle=100, \pm SD). Signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p = 0,0001$. Der Kontrollwert entspricht der Palmitinsäureaufnahme isolierter, ruhender Thrombozyten in Tyrode-Medium und wurde als 100 definiert.

4.3.4 Effekt von Stimulatoren und Inhibitoren der Proteinkinase C auf die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten

Die Ergebnisse aus 4.3.3 zeigen, dass die Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA den deutlichsten Effekt auf die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten im Verhältnis zu den anderen Inkubationsbedingungen hat. Im Folgenden soll geklärt werden, ob eine Inhibition der Proteinkinase C ebenfalls einen Einfluss auf die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten zeigt.

Die Abb. 5 zeigt, dass die Aktivierung der PKC einen signifikanten Anstieg der Palmitinsäureaufnahme hervorruft. Die Hemmung der PKC durch Chelerythrine, einem selektiven PKC-Inhibitor, oder durch Langzeitinkubation mit PMA, zeigte keine Veränderung in

der Aufnahme von exogener Palmitinsäure in die Thrombozyten. Die Präinkubation mit Chelerythrine verhinderte den stimulierenden Effekt der PMA auf die Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten.

Eine übersichtliche Darstellung möglicher intrazellulärer Regulationsmechanismen und aller bisher ermittelten Werte liefert die Abbildung 6.

Abb. 5 Palmitinsäureaufnahme unter Aktivierung und Inhibition der PKC

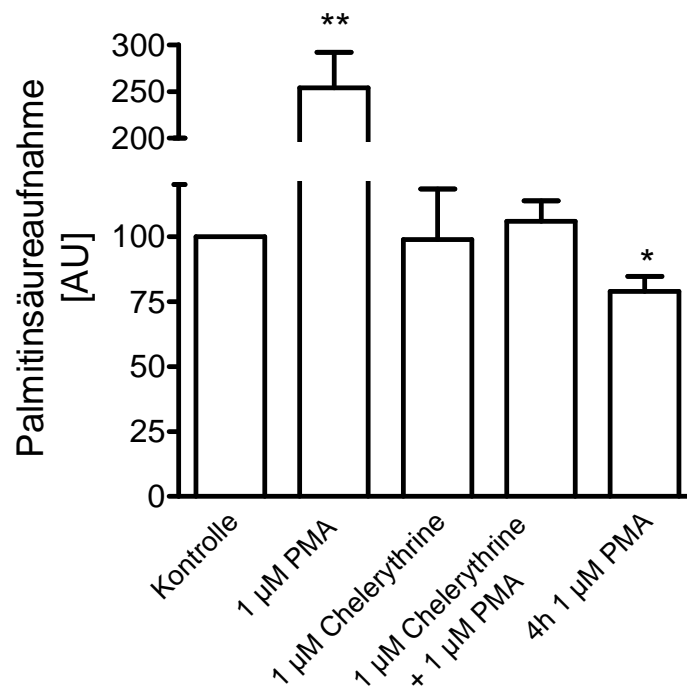
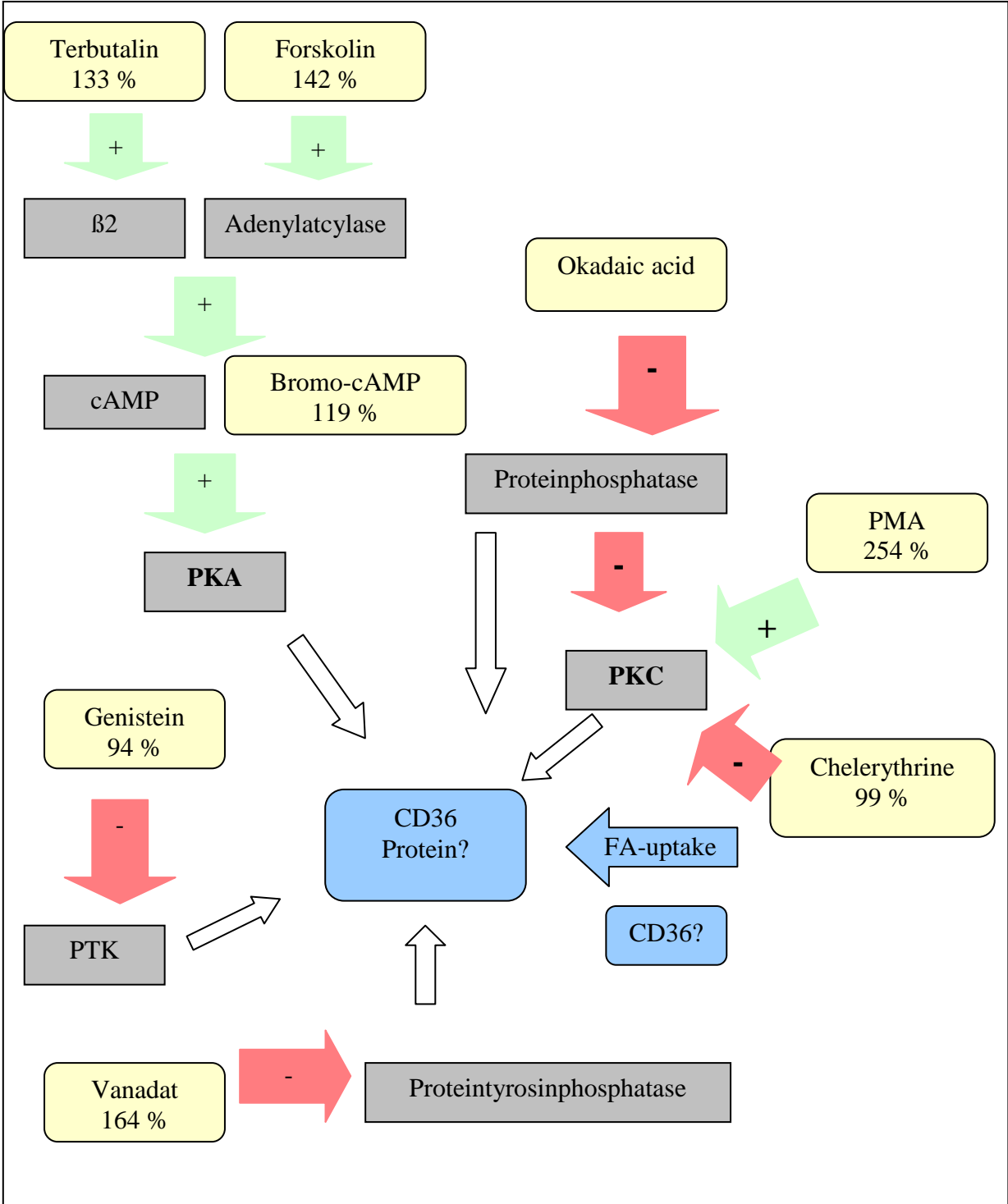


Abb. 5: Darstellung der Mittelwerte der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten (Kontrolle = 100, \pm SD). Signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$; ** $p = 0,0001$. Der Kontrollwert entspricht der Palmitinsäureaufnahme isolierter, ruhender Thrombozyten in Tyrode-Medium und wurde als 100 % definiert.

Abb. 6 Zusammenfassung der Ergebnisse und mögliche Signaltransduktionswege



4.4 Nachweis der Aktivierung und Inhibition der PKC α/β in humanen Thrombozyten

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Inkubation mit PMA in isolierten, ruhenden Thrombozyten zur Aktivierung der Proteinkinase C führt, wurden Aliquote des membranären (M), zytosolischen (Z) und gesamtzellulären (L) Proteins präpariert und elektrophoretisch getrennt. Die subzelluläre Lokalisation der PKC α/β in ruhenden und mit PMA stimulierten Thrombozyten wurde mit Immunoblots nachgewiesen. Die PKC α/β -Aktivierung ist mit einer Translokation aus dem Zytosol in die Membran verbunden (Abb. 7).

Abb. 7 Translokation der PKC α/β durch Stimulation mit PMA

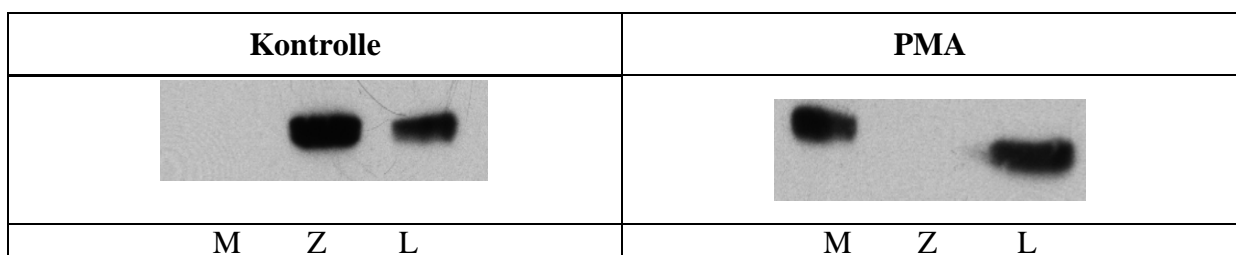


Abb. 7: Immunoblots; die Blots wurden mit einem spezifischen, gegen PKC α/β gerichteten Antikörper inkubiert. M = Membranfraktion, Z = Zytosolfraktion und L = Lysat. Extrazelluläre Konzentration der Inkubationsbedingungen: PMA = 1 μ M, Chelerythrine = 1 μ M; Pro Bande = 5 x 10⁷ Thrombozyten.

Ob der hemmende Effekt von Chelerythrine auf die Aktivität der PKC mit einer Hemmung der PKC α/β -Translokation einhergeht, wird kontrovers diskutiert.

Abb. 8 Aktivierung und Hemmung der PKC α/β

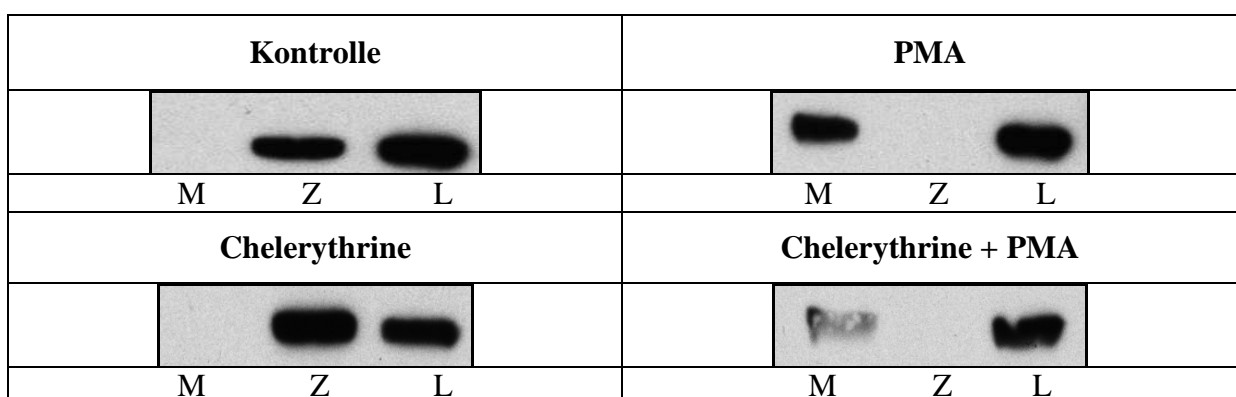


Abb. 8: Immunoblots; die Blots wurden mit einem spezifischen, gegen PKC α/β gerichteten Antikörper inkubiert. M = Membranfraktion, Z = Zytosolfraktion und L = Lysat. Extrazelluläre Konzentration der Inkubationsbedingungen: PMA = 1 μ M, Chelerythrine = 1 μ M; Pro Bande = 5 x 10⁷ Thrombozyten.

4.5 Nachweis der Phosphorylierung von Proteinen in der Membran humaner Thrombozyten

Um zu klären, ob die Aktivierung der PKC zu einer Phosphorylierung von Membranproteinen führt, wurden Autoradiografien erstellt. Dazu wurden ruhende Thrombozyten mit [P^{32}]Phosphorsäure inkubiert und mit PMA stimuliert. Die membranären Proteine wurden elektrophoretisch getrennt und die mit radioaktivem Phosphat phosphorylierten Proteine mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht. Im Vergleich zur Kontrolle erscheinen einige Banden im Vergleich zur Kontrolle (ohne PMA) deutlicher (Abb. 9). Die phosphorylierten Proteine scheinen insbesondere im Bereich zwischen 66 und 94 kDa zu wandern.

Abb. 9 Nachweis phosphorylierter Proteinbanden

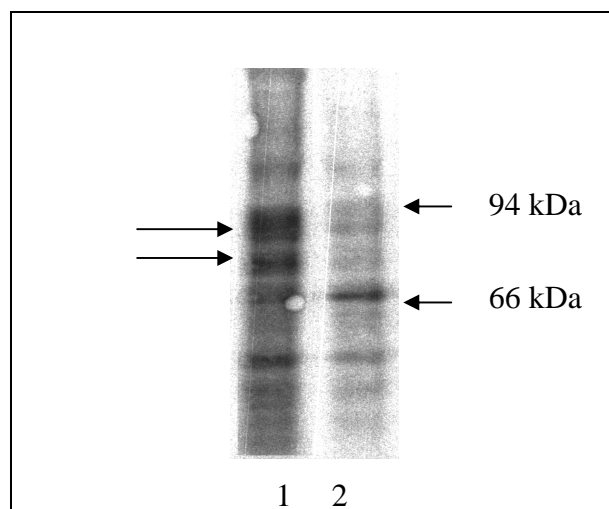


Abb. 9: Autoradiogramm; Inkubation mit [P^{32}] H_3PO_4 ; Membranpräparation mit $1,2 \times 10^8$ Thrombozyten pro Bande; 1 = $1 \mu M$ PMA und 2 = Kontrolle

Es wurden verschiedene membranständige Fettsäuretransporter beschrieben. In Thrombozyten wurde CD36 nachgewiesen [102, 142], dessen Identität mit dem Fettsäuretransporter FAT später mit 85 % angegeben wurde [3]. Da die extrazelluläre Phosphorylierung von CD36 bereits gezeigt wurde [64, 72] und *in silico* weitere intrazelluläre potenzielle Phosphorylierungsstellen bekannt sind (siehe Einleitung Kap. 1.3.1), hielten wir CD36 für einen aussichtsreichen Kandidaten.

4.6 Zweidimensionale Elektrophorese und Autoradiografie

Wir trennten die Membranproteine zunächst nach deren isoelektrischem Punkt und in einer zweiten Dimension nach ihrer Mobilität unter denaturierenden Bedingungen. Abb. 10 zeigt die 2D-Autoradiogramme von ruhenden und mit PMA stimulierten Thrombozyten. Nach Stimulation mit PMA kommt es zur Phosphorylierung zahlreicher Proteine, auch in dem Bereich, wo wir CD36 vermuten (Pfeile).

Abb. 10 Nachweis von phosphorylierten Proteinen der Thrombozytenmembran

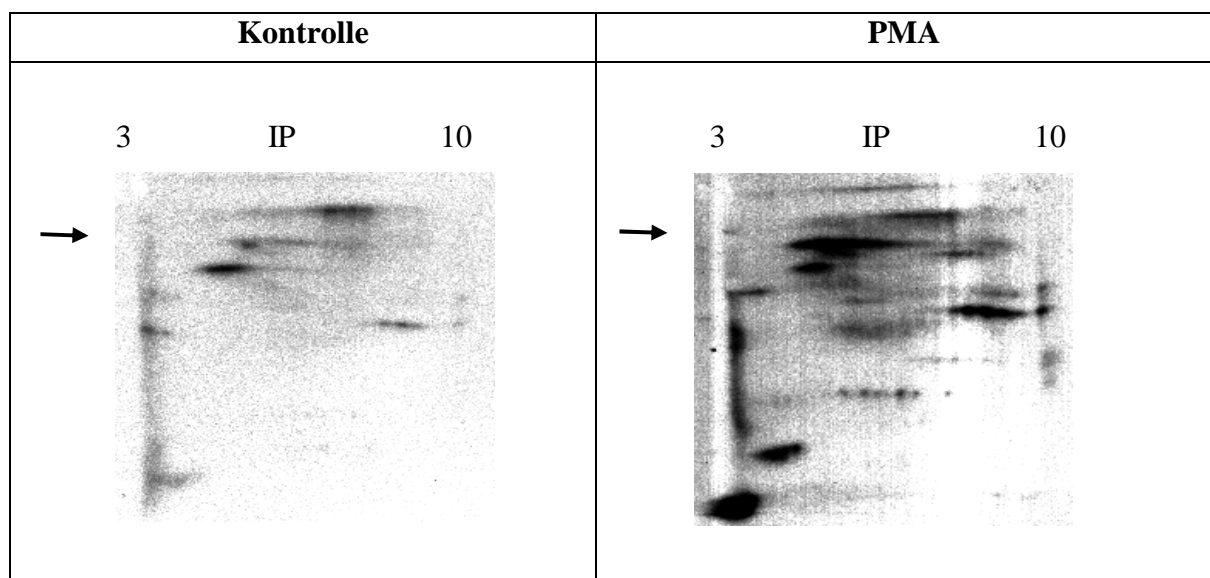


Abb. 10: Autoradiogramme nach 2D-Gelelektrophorese; Inkubation mit $[P^{32}] H_3PO_4$; Membranpräparation mit $1,4 \times 10^9$ Thrombozyten pro Blot, PMA-Inkubation mit $1 \mu M$ PMA

4.7 Nachweis der Phosphorylierung von CD36 durch PMA-Stimulation

Um nachzuweisen, dass CD36 zu den Proteinen in der Membran von humanen Thrombozyten gehört, die durch die PMA-Stimulation phosphoryliert werden, wurde nach einer Membranpräparation der Thrombozyten eine 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot durchgeführt. Da unsere Versuche, CD36 mittels Immunoblot des 2D-Gels zu identifizieren, mehrfach misslingen, suchten wir die Kooperation mit der auf diesem Gebiet ausgewiesenen Arbeitsgruppe von Massimo, Alessio (DIBIT, San Raffaele Scientific Institute, Mailand, Italien).

Nach einer durch uns durchgeführten Membranpräparation humaner Thrombozyten wurden die Membranproteine, um CD36 zu filtern, durch die Arbeitsgruppe von Massimo, Alessio zunächst eindimensional (SDS-Page) und dann durch einen Western Blot getrennt. Danach wurde CD36 mit dem gegen CD36 gerichteten Antikörper (Mo25) gekennzeichnet. Die Membranfraktion, die vorher mit PMA inkubiert wurde, wurde zu einem Teil mit alkalischer Phosphatase inkubiert, um eine mögliche Phosphorylierung/ Dephosphorylierung von CD36 nachzuweisen. Da bekannt ist, dass es eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes in den sauren pH-Bereich durch Phosphorylierung gibt, wurden die mit dem Antikörper gekennzeichneten CD36-Moleküle im 2D Gel nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die dazugehörigen Immunoblots zeigen (Abbildungen 13), dass eine Fraktion der CD36-Moleküle (Pfeil in Abb. 11b) sich nach Inkubation mit PMA im Gegensatz zu der Kontrolle (Abb. 11a) mehr in den sauren pH-Bereich verschiebt, was einer zusätzlichen Phosphorylierung des Proteins entsprechen kann. Die Dephosphorylierung von Proteinen durch Phosphatasen geht mit einer Verschiebung der Moleküle in den mehr basischen pH einher. Die Abbildung 11c zeigt den Immunoblot der zuerst mit PMA inkubierten Thrombozyten und anschließender Inkubation mit Alkalischer Phosphatase, dabei ist eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes der gesamten CD36-Moleküle in Richtung zum basischen pH zu beobachten.

Abb. 11 Phosphorylierung von CD36 in humanen Thrombozyten

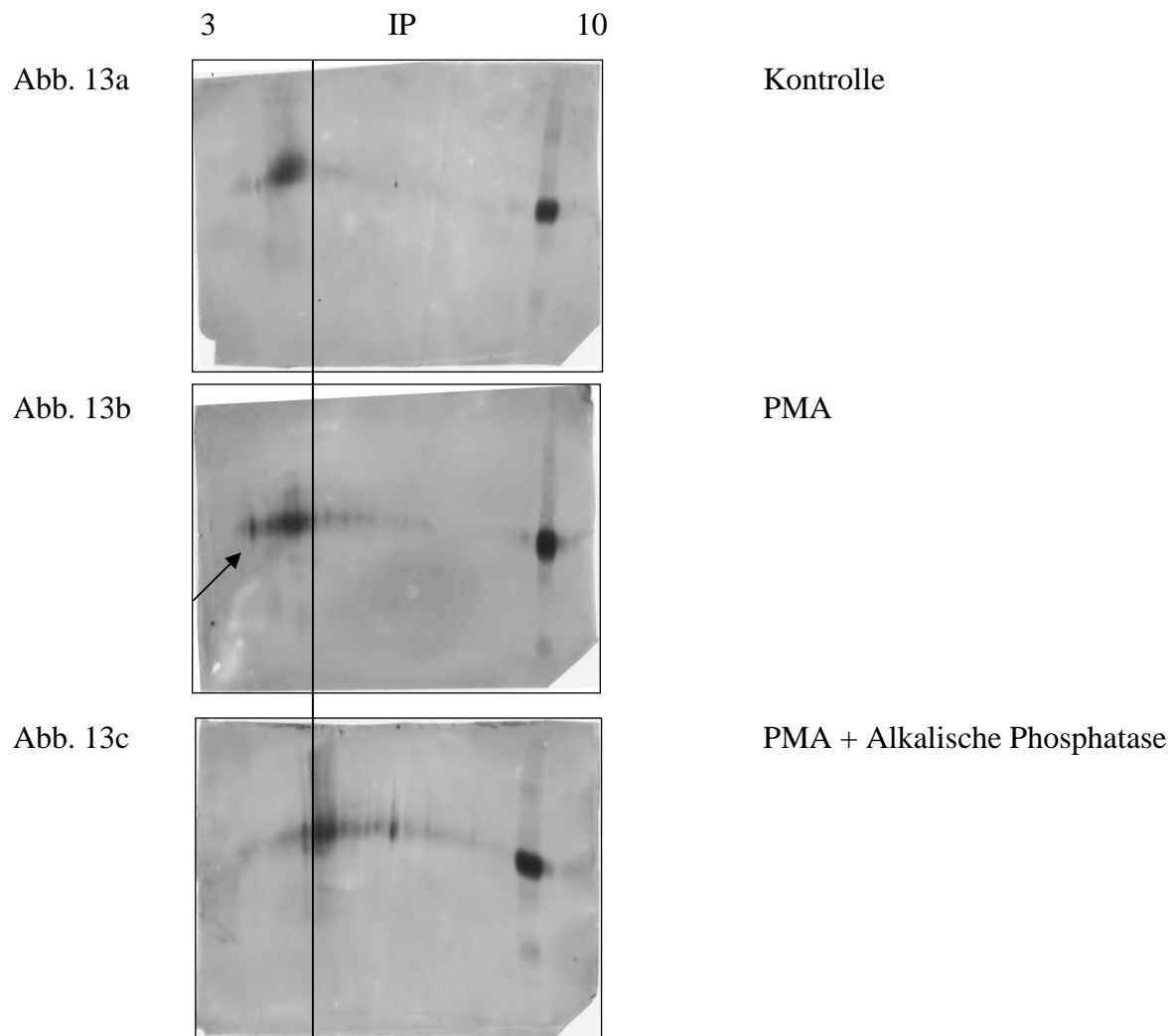


Abb. 11: Immunoblots; die Blots wurden mit einem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper (Mo25) inkubiert. Pro Blot = $9,7 \times 10^8$ Thrombozyten

5 Diskussion

5.1 Humane Thrombozyten und Fettsäuren

Thrombozyten benötigen exogene Fettsäuren für ihren Stoffwechsel. Dutta-Roy et al. konnten nachweisen, dass FAT/CD36 am Transport von Arachidonsäure in humanen Thrombozyten beteiligt ist [46]. Die Eicosanoidbiosynthese in Thrombozyten ist Voraussetzung für die physiologische Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten. Es war deshalb davon auszugehen, dass die Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten einer Regulation unterliegt.

Für die Versuche der Fettsäureaufnahme von humanen Thrombozyten wählten wir Palmitinsäure als Substrat. Guthmann et al. haben bei ihren Untersuchungen zur Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten Palmitinsäure als freie Fettsäure verwendet [64]. Palmitinsäure ist als Substrat der β -Oxidation eine wichtige metabolische Energiequelle für humane Thrombozyten, ihre Oxidation macht 21 % des ATP-Umsatzes aus [62]. Die Palmitinsäure spielt aber auch eine wichtige Rolle bei der postrationalen Modifikation verschiedener Proteine. Sie macht mit etwa 74 % den größten Anteil der Fettsäuren aus, die kovalent an Proteinen ruhender Thrombozyten gebunden sind. Die Palmitoylierung thrombozytärer Proteine führt nach Thrombin-Aktivierung zu einem verstärkten Einbau der Proteine in membran-assoziierte Domänen [108]. Der Anteil der freien Palmitinsäure an der Gesamtkonzentration freier Fettsäuren im Serum ($7,5 \text{ nM} \pm 2,5$) beträgt etwa 25 % [120]. Das verdeutlicht die physiologische Bedeutung der Palmitinsäure, die sich nicht auf Thrombozyten beschränkt.

5.2 Präparation humaner Thrombozyten

Bei der Präparation humaner Thrombozyten muss darauf geachtet werden, dass es nicht zur Aktivierung von Signalkaskaden und nachfolgender Aggregation kommt. Um die Durchführbarkeit und Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten, müssen die präparierten Plättchen in „ruhendem“ Zustand sein und sollten einige Stunden haltbar sein. Das Protokoll, nach dem wir Thrombozyten präparierten, wurde von Mustard et al. [107] entwickelt und von Guthmann et al. [64] modifiziert. Statt Apyrase (ATP-Diphosphohydrolase) wurde Prostaglandin I₂ (Prostacyclin) zur Aggregationshemmung verwendet, um für die späteren Experimente jeden Einfluss auf die ATP-Konzentration ausschließen zu können. Nach dieser Methode isoliert, bewahren Thrombozyten ihre Funktionsfähigkeit in einem Medium mit

physiologischer Elektrolytkonzentration, indem Glucose als Energiequelle dient. Albumin verhindert das Adhären und die vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten. PH-Wert und Temperatur müssen während der gesamten Präparation konstant gehalten werden. Die Blutspender sollten bei Entnahme nüchtern sein und keine Aggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure eingenommen haben.

Für die unterschiedlichen Experimente benötigten wir verschiedene Mengen an Thrombozyten, was durch die Entnahme von verschiedenen Vollblutmengen erreicht wurde. Wir untersuchten die Qualität der Präparation in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der Menge des zu präparierenden Blutes die Thrombozytenausbeute weitestgehend gleich bleibt und die Verunreinigung durch andere Zellen nicht zunimmt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Thrombozyten aus dem Blut verschiedener Spender und zu verschiedenen Zeiten isoliert wurden, zeigt das Ergebnis die gute Reproduzierbarkeit und gute Qualität der einzelnen Präparationen und Versuche.

5.3 Palmitinsäureaufnahme von humanen Thrombozyten

Mit der von Guthmann et al. [64] etablierten Methode zur Messung der initialen Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten gelang es uns, die Aufnahme exogener Fettsäure von Thrombozyten sehr gut reproduzierbar zu bestimmen.

Es war zu erwarten, dass ein wesentlicher Anteil der initialen Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten proteinvermittelt erfolgt. Unsere Experimente bestätigten das Vorhandensein einer nicht-linearen, sättigbaren Funktion der Palmitinsäureaufnahme in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration freier Fettsäure. Damit war der experimentelle Nachweis erbracht, dass die Untersuchungen zur Regulation der Fettsäureaufnahme durch membranäre Proteine, wie zum Beispiel FAT/CD36 sinnvoll sind.

5.3.1 Einfluss intrazellulärer Phosphorylierung auf die Palmitinsäureaufnahme

5.3.1.1 Der Effekt von Okadaic Säure auf die Palmitinsäureaufnahme

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen, die durch Proteinkinasen und Phosphatasen reguliert wird, gehört zu den wichtigsten Regulationsmechanismen von fast allen Zellfunktionen. Phosphatasen, die Serin- und Threoninreste dephosphorylieren sind in fast allen Zellen zu

finden, davon sind die PP1, die PP2a und die PP2b die wichtigsten [35]. Sie unterscheiden sich z.B. durch ihre Substratspezifität und ihre Sensitivität gegenüber bestimmten Inhibitoren. Okadaic Säure ist ein Polyätherderivat einer C₃₈-Fettsäure und gilt als potenter Inhibitor der Proteinphosphatase 1 und 2a [34]. In Thrombozyten konnte bisher gezeigt werden, dass Okadaic Säure und folglich die Proteinphosphatase-Aktivität in die Regulation des Phosphorylierungsstatus von Ca²⁺-Kanälen involviert ist und den Ca²⁺-Einstrom reguliert [75]. Wir konnten zeigen, dass die Fettsäureaufnahme von humanen Thrombozyten durch Okadaic Säure erhöht wurde. Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 4) stimmt gut mit den bekannten Km-Werten der Okadaic Säure für PP1 und PP2a überein. Es ist bekannt, dass die PP2a bei Konzentrationen von 1 nM und die PP1 ab einer Konzentration von 10-15 nM Okadaic Säure gehemmt wird [98].

5.3.1.2 Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten und Proteinkinase-Aktivität

In der Arbeit von Standaert et al [134] wird beschrieben, dass Okadaic Säure den Glucosetransport über eine Aktivierung der atypischen PKC Isoformen ζ und λ in Ratten-Adipozyten erhöht. Es ist bekannt, dass die Proteinphosphatasen PP1 und PP2a, die durch Okadaic Säure gehemmt werden, über Dephosphorylierung von Ser/Thr-Resten intrazelluläre Proteine regulieren können. Zu diesen Proteinen gehört auch die Proteinkinase C [68, 85]. Ricciarelli et al [118] beschreiben eine reversible Inaktivierung der PKC α mittels Dephosphorylierung durch Proteinphosphatase 1 und 2 und, vice versa, erhöht die Hemmung der Proteinphosphatase 2b die PKC-Aktivität in Endothelzellen [97].

In dieses Konzept passt, dass die Aktivierung der PKC durch PMA den größten Einfluss auf die thrombozytäre Fettsäureaufnahme hatte.

Da auch die Aktivierung der Proteinkinase A zu einer leichten Erhöhung der Fettsäureaufnahme geführt hat, ist nicht auszuschließen, dass es verschiedene intrazelluläre Wege bei der Regulierung der Fettsäureaufnahme über Proteinphosphorylierung gibt.

5.3.1.3 PKC – Aktivierung erhöht die Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten

Die Proteinkinase C gehört zu den wichtigsten Gliedern der intrazellulären Signaltransduktionskette. Phorbolster wie PMA induzieren die Aktivierung der Proteinkinase C und die damit verbundene Translokation vom Zytosol zur Zellmembran. Als ein potenter und spezifischer Inhibitor der PKC wurde ein Benzophenanthridin-Alkaloid, Chelerythrine

beschrieben [74]. Verschiedene Autoren haben über die funktionelle Hemmung der PKC hinaus auch eine Hemmung der Translokation vom Zytosol in die Membran postuliert [30, 91, 94]. Breton et al. [26] zeigen eine Erhöhung der Transferrate von Arachidonsäure in Rattenthrombozyten durch Aktivierung der PKC mit PMA. Durch einen PKC-Inhibitor (Staurosporin) konnte die durch PMA induzierte Transferrate von Arachidonsäure gehemmt werden. Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten bei Stimulierung der Proteinkinase C durch PMA. Unter Chelerythrine war, wie wir erwarteten, keine Änderung der Fettsäureaufnahme zu beobachten, auch nicht nach darauf folgender Aktivierung der PKC mit PMA.

Borner et al. und Young et al. konnten eine Inaktivierung der Proteinkinase C infolge Downregulation durch Langzeitstimulierung mit Phorbol ester zeigen [25, 156]. In unseren Versuchen führte die Downregulation der PKC durch Langzeitstimulierung mit PMA zu keiner Änderung der Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten, was die mögliche Inaktivierung der Proteinkinase C durch Langzeitstimulierung mit PMA erklären könnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine PKC-Aktivierung zu einer signifikanten Erhöhung der Palmitinsäureaufnahme humaner Thrombozyten führte. Somit ist davon auszugehen, dass die Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten den Regulationsmechanismen der Proteinkinase C unterliegt.

5.3.2 Nachweis der PKC – Aktivierung

Bislang wurden zwölf verschiedene Isoenzyme der Proteinkinase C beschrieben [41, 42, 77]. Unterteilt werden diese Isoformen in drei große Gruppen, die sog. „classical“ PKC-Formen (α , β_I , β_{II} , γ), die durch Ca^{2+} , Diacylglycerol (DAG) oder PMA stimuliert werden können, die sog. „novel“ PKCs (δ , ϵ , η , θ), stimulierbar durch DAG und PMA; ihnen fehlt jedoch die Ca^{2+} -Bindungsdomäne und die sog. „atypical“ PKCs (ζ , μ , λ , ν), die durch keine der hier erwähnten Substanzen aktiviert werden können.

In humanen Thrombozyten konnten bisher die Isoformen PKC α , β_I , β_{II} , δ und ζ identifiziert werden [38, 39, 55].

Um nachzuweisen, dass unter unseren experimentellen Bedingungen auch eine PKC-Aktivierung stattfindet und somit die Möglichkeit einer Beteiligung der PKC am Fettsäuretransport von Thrombozyten besteht, wurde ein spezifischer, gegen PKC α/β gerichteter Antikörper

verwendet. Die Ergebnisse der Membranpräparation und des anschließenden Immunoblots zeigten, dass unter PMA eine Aktivierung der PKC in Form der Translokation vom Zytosol in die Membran erfolgt.

Die Vorinkubation mit Chelerythrine und anschließende PMA-Stimulation zeigt nur eine schwache Bande in der Membranfraktion und lässt keine eindeutigen Schlüsse ziehen. Chao et al. verwenden Chelerythrine in einer Konzentration von 30 μM und sehen eine Abnahme der PKC α - Translokation vom Cytosol in die Membran auf 67 bzw. 61 % [30]. Lu et al. und Lai et al. verwenden jeweils eine Konzentration von 5 μM Chelerythrine und erreichen eine Abnahme der PKC α -Translokation auf etwa 64 % (Schätzung beruht auf Auswertung eines Balkendiagrammes, [94]) bzw. der PKC β - Translokation auf 81 % [91]. In den zitierten Arbeiten werden keine Immunoblots gezeigt, was die Interpretation der Daten erschwert. Im Gegensatz zu unseren Experimenten wird nicht PMA, dessen Bindung an die PKC durch Chelerythrine nicht beeinflusst wird [74], zur Stimulation verwendet. Möglicherweise könnten die unterschiedlichen Bindungsstellen beider Reagenzien an der PKC eine Rolle spielen, denn Chelerythrine inhibiert die PKC über Interaktion mit der Substratbindungsdomäne (ATP oder Protein) und PMA bindet an die regulatorische Domäne (für Diacylglycerol) der PKC [61, 74]. Die Fettsäureaufnahme zeigte unter dieser Bedingung keine Veränderung und die schwache Bande der Membranfraktion in diesem Blot lässt auf ein Überwiegen der Inhibition der PKC schließen. Unsere Ergebnisse, die keine Hemmung der PMA-stimulierten Translokation der PKC α/β zeigen, stehen mit den grundlegenden Daten von Herbert et al. zum Wirkungsmechanismus von Chelerythrine in Einklang. Es kann davon ausgegangen werden, dass in unseren Experimenten eine Aktivierung der Proteinkinase C in humanen Thrombozyten stattfindet und an der Regulation der Fettsäureaufnahme beteiligt ist.

5.4 Phosphorylierung des Membranproteins CD36 durch Proteinkinase C

Wir stellten uns die Frage, ob FAT/CD36 eines der Substrate der Proteinkinase C in humanen Thrombozyten ist. Zunächst wiesen wir autoradiographisch eine Proteinbande zwischen 66 und 94 kDa nach, die nach Inkubation mit PMA geschwärzt war (Abb. 9). In der Literatur wird die Molekularmasse von CD36 in humanen Thrombozyten mit 97 kDa [115], in anderen Arbeiten mit 87 kDa [112] angegeben. Yamamoto et al. bestimmten mit vier verschiedenen, spezifisch gegen CD36 gerichteten Antikörpern die Molekularmasse des thrombozytären CD36 mit $88,3 \pm$

2,2 kDa [154]. Um die fragliche Proteinbande genauer zu analysieren, trennten wir die thrombozytären Membranproteine zweidimensional auf. Tandon et al. ermittelten mit der 2D-Gelelektrophorese den isoelektrischen Punkt für thrombozytäres CD36 und stellten dabei fest, dass eine größere Komponente des CD36 bei IP 5,0-5,5 und eine kleinere Komponente bei IP 5,5-5,8 liegt [142].

In dem Bereich, in dem wir CD36 erwarteten war in der Autoradiografie unter PMA-Stimulation, der molekularen Masse und dem isoelektrischen Punkt entsprechend eine verstärkt phosphorylierte Proteinbande sichtbar. Um das phosphorylierte Protein als das thrombozytäre CD36 zu identifizieren, wurden die thrombozytären Proteine nach 2D-Trennung mittels Immunoblot mit den spezifischen gegen CD36 gerichteten Antikörpern Mo95 und H-300 analysiert. Die Versuche mit diesen Antikörpern waren wenig aussagekräftig. Andere Autoren beschreiben ebenfalls unscharfe oder geteilte Banden beim immunologischen Nachweis von CD36. Guarini et al. zum Beispiel entdeckten in Monozyten mit dem Antikörper Mo91 unreife Vorläuferstufen von CD36 bei 74 kDa und das reife Protein bei 95 kDa [60]. Der problematische immunologische Nachweis von CD36 kann vermutlich auf die starke Glykosylierung und die variablen Struktureigenschaften des Proteins zurückzuführen sein.

In dieser Situation bot sich Massimo Alessio (DIBIT, San Raffaele Scientific Institute, Mailand, Italien) als Kooperationspartner an, da in seiner Arbeitsgruppe die 2D-Gelelektrophorese für CD36 optimiert wurde. Die möglicherweise durch nicht-kovalent gebundene Lipide hervorgerufenen pH-Heterogenität des CD36 bei der isoelektrischen Fokussierung und die Kreuzreaktivität des CD36-Antikörpers wurden minimiert. Dazu wurde die Membranfraktion der Thrombozyten parallel in zwei Gelen elektrophoretisch getrennt und CD36 in einem der Gele mittels Immunoblot lokalisiert. In dem zweiten Gel wurde die entsprechende Region ausgeschnitten, das Protein aus dem Gel eluiert und entsalzt. Bei der anschließenden isoelektrischen Fokussierung und SDS-Elektrophorese wurde deutlich, dass die Inkubation der Thrombozyten mit PMA den Phosphorylierungsstatus des Hauptteiles der CD36-Bande nicht beeinflusst, sondern offensichtlich eine Fraktion des CD36 phosphoryliert, die im Immunoblot links der Hauptbande (niedrigerer pH) zu sehen ist. Das bestätigt den Phosphorylierungsstatus von CD36 in ruhenden Thrombozyten. Ash et al. konnten zeigen, dass CD36 in ruhenden Thrombozyten nach Expression phosphoryliert wird und dann die Translokation zur Zellmembran erfolgt [15].

Die mit PMA behandelten Thrombozyten, die folgend mit alkalischer Phosphatase inkubiert wurden, zeigten eine Zurückverlagerung des ganz überwiegenden Teils des CD36 in den

basischeren pH-Bereich. In unseren Versuchen mit ruhenden Thrombozyten liegt CD36 schon in phosphorylierter Form vor. Die durch PMA hervorgerufene Phosphorylierung ist somit eine zusätzliche Phosphorylierung, die die Verschiebung der CD36-Fraktion in den sauren pH vermittelte. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Fraktion der CD36-Moleküle für den Fettsäuretransport in humanen Thrombozyten verantwortlich ist und durch Proteinkinase C mittels Phosphorylierung aktiviert und reguliert wird.

Das Protein CD36 besteht aus einer großen extrazellulären Domäne mit mehreren möglichen Phosphorylierungsstellen, die unter anderem von Hatmi et al. und Asch et al. beschrieben wurden [15, 72]. Die intrazelluläre Domäne weist eine Threonin-Phosphorylierungsstelle auf, die als potentielle intrazelluläre Phosphorylierungsstelle zur Regulation der Fettsäureaufnahme in Frage kommt. Dieses Threonin kann direkt durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden oder mittelbar, d.h. durch andere, PKC-regulierte Proteinkinasen phosphoryliert werden.

5.5 Ausblick

Unsere Untersuchungen und die bereits vorliegenden Erkenntnisse über CD36 machen es sehr wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von CD36 und die damit verbundene Regulierung der Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten Proteinkinase C vermittelt ist. Um unsere Ergebnisse zu bestätigen gibt es verschiedene Ansatzpunkte die weiterführend in Frage kämen. Es gibt Zellreihen, wie z.B. Fibroblasten der Zelllinie Ob17PY, die kein CD36 exprimieren [79]. Es dürfte bei Untersuchungen mit diesen Zellen zu keiner Veränderung der Fettsäureaufnahme nach PKC-Aktivierung kommen im Gegensatz zu Fibroblasten, die CD36 exprimieren. Da es sich um Kulturzellen handelt, könnten weitere Überlegungen sein mit Thrombozyten CD36-defizienter ([-/-]-, „knock-out“-) Mäuse [48] zu arbeiten. Bei Thrombozyten CD36-defizienter Mäuse dürfte es ebenfalls zu keiner Steigerung der Fettsäureaufnahme durch PMA kommen, während der Effekt bei Thrombozyten der Kontrollgruppe (FAT/CD36-[+/+]) zu beobachten sein müsste. Es könnte gezeigt werden, dass die PKC-vermittelte Phosphorylierung von CD36 an der Fettsäureaufnahme von Thrombozyten beteiligt ist. Eine der einfachsten experimentell durchzuführenden Untersuchungsansätze wäre die Arbeit mit Thrombozyten CD36-defizienter Menschen. Mit den schon etablierten Methoden könnte die Experimente durchgeführt werden und auch hier dürften die Ergebnisse zu keiner Veränderung der Fettsäureaufnahme nach PKC-Aktivierung führen.

Bei weiterführenden Untersuchungen zur Regulation der proteinvermittelten Fettsäure-Aufnahme würden sich in Abhängigkeit von der Fragestellung alle genannten Modelle für den spezifischen Nachweis der Beteiligung von CD36 eignen.

5.5.1 Bedeutung unserer Ergebnisse für die medizinische Klinik

Die proteinvermittelte zelluläre Aufnahme exogener, langkettiger Fettsäuren ist ein relativ neuer Aspekt auf dem Gebiet des Lipid-Stoffwechsels. Bisher konnten mehrere Untersuchungen zur gestörten Fettsäureaufnahme und daraus folgender Krankheitsbilder ermittelt werden. So führt die CD36-Defizienz zu einer gestörten myokardialen Aufnahme langkettiger Fettsäure und ist mit der Pathogenese der Herzhypertrophie, der KHK, des Hypertonus und anderer kardialer Erkrankungen assoziiert [33, 65, 84, 101, 110, 140, 141]. Wie schon in der Einleitung erwähnt, wurden in den letzten Jahren vermehrt die Rolle von CD36 bei der Pathogenese einer Insulinresistenz, des metabolischen Syndroms mit Adipositas und Diabetes diskutiert [10, 22, 48, 65, 76, 79, 104, 117, 139]. Die Ergebnisse mehrerer Autoren bestätigen die Beteiligung der proteinvermittelten Fettsäureaufnahme an der Pathogenese von Stoffwechselerkrankungen und macht es wahrscheinlich, dass in Zukunft das Gebiet mehr an klinischer Bedeutung gewinnen wird. Der Regulationsmechanismus der PKC-vermittelten Fettsäureaufnahme könnte beispielsweise einen Ansatzpunkt für pharmakologische Interventionen darstellen.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation der initialen Aufnahme langkettiger Fettsäuren in humanen Thrombozyten zu untersuchen. Zunächst konnten wir zeigen, dass die initiale Aufnahme langkettiger Fettsäuren, zumindest im physiologischen Konzentrationsbereich freier Fettsäuren, überwiegend proteinvermittelt ist. Die zu Beginn der Untersuchung vorliegenden Kenntnisse über den proteinvermittelten Fettsäuretransport machten eine Beteiligung von CD36 wahrscheinlich. Wir untersuchten deshalb die intrazelluläre Phosphorylierung von CD36 und deren Bedeutung für den Fettsäuretransport in Thrombozyten. Wir zeigten eine PKC-vermittelte Steigerung der initialen Fettsäureaufnahme humaner Thrombozyten, die mit einer Phosphorylierung von CD36 korreliert. Bei der Untersuchung verschiedener Signaltransduktionswege hatte die Aktivierung der PKC den deutlichsten Einfluß auf die Fettsäureaufnahme. Die indirekte und direkte Aktivierung der Proteinkinase $C\alpha/\beta$ führte zu einer signifikanten Erhöhung der Palmitinsäureaufnahme in Thrombozyten. Umgekehrt verhinderte die Hemmung der PKC durch Chelerythrine die PMA-vermittelte Erhöhung der Fettsäureaufnahme. Unsere Ergebnisse bestätigen den Phosphorylierungsstatus von CD36 in ruhenden Thrombozyten und zeigen darüber hinaus, dass eine Fraktion des CD36 durch die Aktivierung der PKC α/β zusätzlich phosphoryliert wird. Diese Aktivierung geht mit einer 2,54-fachen Steigerung der Aufnahme von Palmitinsäure in Thrombozyten einher. Möglicherweise lässt sich die Konzentration freier Fettsäuren in Zukunft durch die Regulation membranständiger Fettsäuretransporter steuern.

7 Literatur

1. Abumrad N. A., Coburn C. und Ibrahimi A.: Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm, *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1441(1):4-13
2. Abumrad N. A., Harmon C. und Ibrahimi A.: Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process, *J. Lipid Res.* 1998; 39(12):2309-18
3. Abumrad N. A., el-Maghrabi M. R., Amri E. Z., Lopez E. und Grimaldi P. A.: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36, *J. Biol. Chem.* 1993; 268(24):17665-8
4. Abumrad N. A., Perry P. R. und Whitesell R. R.: Insulin antagonizes epinephrine activation of the membrane transport of fatty acids. Potential site for hormonal suppression of lipid mobilization, *J. Biol. Chem.* 1986; 261:2999-3001
5. Abumrad N. A., Park J. H. und Park C. R.: Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein, *J. Biol. Chem.* 1984; 259(14):8945-53
6. Abumrad N. A., Perkins R. C., Park J. H. und Park C. R.: Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte, *J. Biol. Chem.* 1981; 256(17):9183-91
7. Acton S. L., Scherer P. E., Lodish H. F. und Krieger M.: Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, *J Biol Chem* 1994; 269(33):21003-9
8. Ailhaud G.P., Abumrad N. A., Amri E. Z. und Grimaldi P. A., A new look at fatty acids as signal-transducing molecules, *World Rev Nutr Diet.* 1994; 75:35-45.
9. Aitman T. J., Cooper L. D., Norsworthy P. J., et al.: Malaria susceptibility and CD36 mutation, *Nature.* 2000; 405(6790):1015-6
10. Aitman T. J., Glazier A. M., Wallace C. A., et al.: Identification of Cd36 (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats, *Nat Genet.* 1999; 21(1):76-83.
11. Amri E. Z., Bertrand B., Ailhaud G. und Grimaldi P.: Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression, *J. Lipid Res.* 1991; 32(9):1449-56
12. Amri E. Z., Bonino F., Ailhaud G., Abumrad N. A., Grimaldi P. A.: Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors, *J. Biol. Chem.* 1995; 270:2367-71
13. Amri E. Z., Teboul L., Vannier C., Grimaldi P. A. und Ailhaud G.: Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells, *Biochem J.* 1996; 314 (Pt 2):541-6

14. Arita H., Nakano T. und Hanasaki K.: Thromboxane A2: its generation and role in platelet activation, *Prog Lipid Res.* 1989; 28(4):273-301
15. Asch A. S., Liu I., Briccetti F. M., et al.: Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain, *Science* 1993; 262(5138):1436-40
16. Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., et al.: Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae, *J Biol Chem* 1997; 272(20):13242-9
17. Baillie A. G., Coburn C. T. und Abumrad N. A.: Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog, *J. Membr. Biol.* 1996; 153(1):75-81
18. Bastie C., Luquet S., Holst D., Jehl-Pietri C. und Grimaldi P.A.: Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation, *J Biol Chem.* 2000; 275(49):38768-73.
19. Batenburg J. J., Longmore W. J. und van Golde L. M.: The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II epithelial cells in primary culture, *Biochim Biophys Acta* 1978; 529(1):160-70
20. Berk P. D., Potter B. J., Sorrentino D., et al.: Hepatocellular fatty acid uptake is mediated by a plasma membrane fatty acid binding protein closely related to mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990a; 585:379-85
21. Blom N., Gammeltoft S. und Brunak S.: Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *J. Mol. Biol.* 1999; 294(5):1351-62
22. Boden G., Chen X., Ruiz J., White J. V. und Rossetti L.: Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake, *J Clin Invest.* 1994; 93(6):2438-46
23. Bonen A., Dyck D. J., Ibrahimi A. und Abumrad N. A.: Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36, *Am. J. Physiol.* 1999; 276(4):E642-49
24. Bonen A., Luiken J. J., Liu S., et al.: Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles, *Am. J. Physiol.* 1998; 275(3):E471-78
25. Borner C., Filipuzzi I., Wartmann M., Eppenberger U. und Fabbro D.: Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells, *J Biol Chem.* 1989; 264(23):13902-9
26. Breton M. und Colard O.: Protein kinase C promotes arachidonate mobilization through enhancement of CoA-independent transacylase activity in platelets, *Biochem J.* 1991; 280 (Pt 1):93-8
27. Calvo D., Gomez-Coronado D., Suarez Y., Lasuncion M. A. und Vega M. A.: Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL, *J. Lipid Res.* 1998; 39(4):777-88

28. Chabowski A., Górski J., Luiken J. J., Glatz J. F. und Bonen A.: Evidence for concerted action of FAT/CD36 and FABPpm to increase fatty acid transport across the plasma membrane, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2007; 77(5-6):345-53. Review.
29. Chander A. und Fisher A. B.: Choline-phosphate cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in rat granular pneumocytes are increased with exogenous fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta* 1988; 958(3):343-51
30. Chao M. D., Chen I. S. und Cheng J. T.: Inhibition of protein kinase C translocation from cytosol to membrane by chelerythrine, *Planta Med*. 1998; 64(7):662-3
31. Chen M., Yang Y., Braunstein E., Georgeson K. E. und Harmon C. M.: Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2001; 281:E916-E23
32. Clemetson K. J., Pfueller S. L., Luscher E. F. und Jenkins C. S.: Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography, *Biochim. Biophys. Acta* 1977; 464(3):493-508
33. Coburn C. T., Knapp F. J., Febbraio M., Beets A. L., Silverstein R. L. und Abumrad N. A.: Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice, *J. Biol. Chem*. 2000; 275(42):32523-9
34. Cohen P. und Holmes C. F.: Tsukitani Y.: Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation, *Trends Biochem Sci*. 1990; 15(3):98-102
35. Cohen P. T.: Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life, *Trends Biochem Sci*. 1997; 22(7):245-51
36. Collot-Teixeira S., Martin J., McDermott-Roe C., Poston R. und McGregor J. L.: CD36 and macrophages in atherosclerosis, *Cardiovasc Res*. 2007; 75(3):468-77. Review
37. Connelly M. A., de la Llera-Moya M., Monzo P., et al.: Analysis of chimeric receptors shows that multiple distinct functional activities of scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), are localized to the extracellular receptor domain, *Biochemistry* 2001; 40(17):5249-59
38. Cook P. P., Chen J. und Ways D. K.: Interleukin-3 induces translocation and down-regulation of protein kinase C in human platelets, *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 185(2):670-5
39. Crabos M. Fabbro D., Stabel S. und Erne P.: Effect of tumour-promoting phorbol ester, thrombin and vasopressin on translocation of three distinct protein kinase C isoforms in human platelets and regulation by calcium, *Biochem J*. 1992; 288 (Pt 3):891-6
40. Curtis B. R. und Aster R. H.: Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians, *Transfusion*. 1996; 36(4):331-4.
41. Dekker L. V. und Parker P. J.: Protein kinase C--a question of specificity, *Trends Biochem Sci*. 1994; 19(2):73-7

42. Dempsey E. C., Newton A. C., Mochly-Rosen D., et al.: Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279(3):L429-38
43. DiRusso C. C. und Black P. N.: Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-mediated process, *Mol. Cell. Biochem.* 1999; 192:41-52
44. Duplus E., Glorian M. und Forest C.: Fatty acid regulation of gene transcription, *J. Biol. Chem.* 2000, 275:30749-52
45. Dutta-Roy A. K., Crosbie L. C., Gordon M. J. und Campbell F. M.: Platelet membrane glycoprotein IV (CD36) is involved in arachidonic acid induced-platelet aggregation, *Biochem. Soc. Trans.* 1996a; 24(2):167S
46. Dutta-Roy A. K., Gordon M. J., Campbell F. M. und Crosbie L. C.: Arachidonic acid uptake by human platelets is mediated by CD36, *Platelets* 1996b; 7291-5
47. Endemann G., Stanton L. W., Madden K. S., Bryant C. M., White R. T. und Protter A. A.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 1993; 268(16):11811-6
48. Febbraio M., Abumrad N. A., Hajjar D. P., et al.: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism, *J. Biol. Chem.* 1999; 274(27):19055-62
49. Febbraio M., Hajjar D. P. und Silverstein R. L.: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism, *J. Clin. Invest.* 2001; 108(6):785-91
50. Fernandez-Ruiz E., Armesilla A. L., Sanchez-Madrid F. und Vega M. A.: Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2, *Genomics* 1993; 17(3):759-761
51. Fluiter K. und van-Berkel T. J.: Scavenger receptor B1 (SR-B1) substrates inhibit the selective uptake of high-density-lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells, *Biochem. J.* 1997; 326(2):515-9
52. Fujii S., Kawaguchi H. und Yasuda H.: Isolation and partial characterization of an amphiphilic 56-kDa fatty acid binding protein from rat renal basolateral membrane, *J. Biochem. Tokyo.* 1987; 101(3):679-84
53. Fukuchi K., Nozaki S., Yoshizumi T., et al.: Enhanced myocardial glucose use in patients with a deficiency in long-chain fatty acid transport (CD36 deficiency), *J Nucl Med.* 1999; 40(2):239-43.
54. Glatz J. F., Borchers T., Spener F. und van der Vusse G. J.: Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995; 52(2-3):121-7. Review.

55. Grabarek J., Raychowdhury M., Ravid K., Kent K. C., Newman P. J. und Ware J. A.: Identification and functional characterization of protein kinase C isozymes in platelets and HEL cells, *J Biol Chem.* 1992; 267(14):10011-7
56. Greenwalt D. E., Lipsky R. H., Ockenhouse C. F., Ikeda H., Tandon N. N. und Jamieson G. A.: Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine, *Blood* 1992; 80(5):1105-15
57. Greenwalt D. E., Scheck S. H. und Rhinehart J. T.: Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet, *J. Clin. Invest.* 1995; 96(3):1382-8
58. Grimaldi P. A.: Fatty acid regulation of gene expression, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4(5):433-7. Review.
59. Grimaldi P. A., Teboul L., Gaillard D., Armengod A. V. und Amri E. Z.: Long chain fatty acids as modulators of gene transcription in preadipose cells. *Mol Cell Biochem.* 1999 Feb;192(1-2):63-8. Review.
60. Gruarin P., Sitia R. und Alessio M.: Formation of one or more intrachain disulphide bonds is required for the intracellular processing and transport of CD36, *Biochem. J.* 1997; 328(2):635-42
61. Gschwendt M., Kittstein W. und Marks F.: Protein kinase C activation by phorbol esters: do cysteine-rich regions and pseudosubstrate motifs play a role?, *Trends Biochem Sci.* 1991; 16(5):167-9
62. Guppy M., Abas L., Neylon C., et al.: Fuel choices by human platelets in human plasma, *Eur. J. Biochem.* 1997; 244(1):161-7
63. Guthmann F., Haupt R., Looman A. C., Spener F. und Rüstow B.: Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes, *Am. J. Physiol.* 1999; 277(1):L191-6
64. Guthmann F., Maehl P., Preiss J., Kolleck I. und Rüstow B.: Ectoprotein kinase-mediated phosphorylation of FAT/CD36 regulates palmitate uptake by human platelets, *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59(11):1999-2003
65. Hajri T., Ibrahimi A., Coburn C. T., et al.: Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia, and myocardial hypertrophy, *J Biol Chem.* 2001; 276(26):23661-6
66. Hamilton J. A. und Kamp F.: How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?, *Diabetes* 1999; 48:2255-69
67. Hamilton J. A.: Fatty acid transport: difficult or easy?, *J. Lipid Res.* 1998; 39(3):467-81
68. Hansra G., Bornancin F., Whelan R., Hemmings B. A. und Parker P. J.: 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase Calpha correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer, *J Biol Chem.* 1996; 271(51):32785-8

69. Harmon C. M. und Abumrad N. A.: Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids, *J. Membr. Biol.* 1993; 133(1):43-9
70. Harmon C. M., Luce P. und Abumrad N. A.: Labelling of an 88 kDa adipocyte membrane protein by sulpho-N-succinimidyl long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport, *Biochem. Soc. Trans.* 1992; 20(4):811-3
71. Harmon C. M., Luce P., Beth A. H. und Abumrad N. A.: Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport, *J. Membr. Biol.* 1991; 121(3):261-8
72. Hatmi M., Gavaret J. M., Elalamy I., Vargaftig B. B. und Jacquemin C.: Evidence for cAMP-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV (CD36), *J. Biol. Chem.* 1996; 271(40):24776-80
73. Heller A., Koch T., Schmeck J. und van Ackern K.: Lipid mediators in inflammatory disorders, *Drugs* 1998; 55:487-96
74. Herbert J. M., Augereau J. M., Gleye J. und Maffrand J. P.: Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C, *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 172(3):993-9
75. Higashihara M., Takahata K., Kurokawa K. und Ikebe M.: The inhibitory effects of okadaic acid on platelet function, *FEBS Lett.* 1992; 307(2):206-10
76. Holloway G. P., Bonen A. und Spriet L. L.: Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals, *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(1):455S-62S. Review
77. Hug H. und Sarre T. F.: Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?, *Biochem J.* 1993; 291 (Pt 2):329-43
78. Hwang E. H., Taki J., Yasue S., et al.: Absent myocardial iodine-123-BMIPP uptake and platelet/monocyte CD36 deficiency, *J Nucl Med.* 1998; 39(10):1681-4
79. Ibrahimi A., Sfeir Z., Magharaie H., Amri E. Z., Grimaldi P. und Abumrad N. A.: Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93(7):2646-2651
80. Ikeda H.: Platelet membrane protein CD36, *Hokkaido Igaku Zasshi.* 1999; 74(2):99-104
81. Jump D. B.: The biochemistry of N3-polyunsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 2001; 10.1074/jbc.R100062200
82. Kashiwagi H., Tomiyama Y., Honda S., et al.: Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency, *J. Clin. Invest.* 1995; 95(3):1040-6
83. Kashiwagi H., Tomiyama Y., Nozaki S., et al.: Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man, *Hum Genet.* 2001; 108(6):459-66

84. Kashiwagi H., Tomiyama Y., Nozaki S., et al.: A single nucleotide insertion in codon 317 of the CD36 gene leads to CD36 deficiency, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16(8):1026-32
85. Keranen L. M., Dutil E. M., Newton A. C.: Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations, *Curr Biol.* 1995; 5(12):1394-1403
86. Kerkhoff C., Sorg C., Tandon N. N. und Nacken W.: Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells, *Biochemistry* 2001; 40(1):241-8
87. Kleinfeld A. M., Chu P. und Romero C.: Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting, *Biochemistry* 1997; 36(46):14146-58
88. Kleinfeld A. M.: Lipid phase fatty acid flip-flop: Is it fast enough for cellular transport?, *J. Membr. Bio.* 2000; 175:79-86
89. Kolleck I., Guthmann F., Ladhoff A. M., Tandon N. N., Schlame M. und Rüstow B.: Cellular cholesterol stimulates acute uptake of palmitate by redistribution of fatty acid translocase in type II pneumocytes, *Biochemistry* 2002; 41(20):6369-75
90. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970; 227(259):680-5
91. Lai C. W., Hsu F. L. und Cheng J. T.: Stimulatory effect of paeoniflorin on adenosine A-1 receptors to increase the translocation of protein kinase C (PKC) and glucose transporter (GLUT 4) in isolated rat white adipocytes, *Life Sci.* 1998; 62(17-18):1591-5
92. Liang X., Nazarian A., Erdjument-Bromage H., Bornmann W., Tempst P. und Resh M. D.: Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction, *J. boil. Chem.* 2001; 276:30987-94
93. Lobo M. V., Huerta L., Ruiz-Velasco N., et al.: Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids, *J Histochem Cytochem.* 2001; 49(10):1253-60.
94. Lu K., Otani H., Yamamura T., et al.: Protein kinase C isoform-dependent myocardial protection by ischemic preconditioning and potassium cardioplegia, *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001; 121(1):137-48
95. Luiken J. J., Schaap F. G., van Nieuwenhoven F. A., van der Vusse G. J., Bonen A. und Glatz J. F.: Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins, *Lipids* 1999; 34:S169-75
96. Luiken J. J., Van-Nieuwenhoven F. A., America G., van der Vusse G. J. und Glatz J. F.: Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins, *J. Lipid Res.* 1997; 38(4):745-58

97. Lum H., Podolski J. L., Gurnack M. E., Schulz I. T., Huang F. und Holian O.: Protein phosphatase 2B inhibitor potentiates endothelial PKC activity and barrier dysfunction, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 281(3):L546-55
98. MacKintosh C. und Cohen P.: Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants, *Biochem J.* 1989; 262(1):335-9
99. Maniscalco W. M., Finkelstein J. N. und Parkhurst A. B.: Effects of exogenous fatty acids and inhibition of de novo fatty acid synthesis on disaturated phosphatidylcholine production by fetal lung cells and adult type II cells, *Exp. Lung Res.* 1989; 15(3):473-89
100. Maniscalco W. M., Stremmel W. und Heeney C. M.: Uptake of palmitic acid by rabbit alveolar type II cells, *Am. J. Physiol.* 1990; 259(4):L206-12
101. Masuda D., Hirano K., Oku H. et al.: Chylomicron remnants are increased in the postprandial state in CD36 deficiency, *J Lipid Res.* 2009; 50(5):999-1011
102. McGregor J. L., Catimel B., Parmentier S., Clezardin P., Dechavanne M., Leung L. L.: Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein IIIb. Interaction with thrombospondin and its role in platelet aggregation, *J Biol Chem.* 1989; 264(1):501-6
103. Michelson A. D., Wencel-Drake J. D., Kestin A. S. und Barnard M. R.: Platelet activation results in a redistribution of glycoprotein IV (CD36), *Arterioscler Thromb.* 1994; 14(7):1193-201
104. Miyaoka K., Kuwasako T., Hirano K., Nozaki S., Yamashita S. und Matsuzawa Y.: CD36 deficiency associated with insulin resistance, *Lancet.* 2001; 357(9257):686-7
105. Motojima K., Passilly P., Peters J. M., Gonzalez F. J. und Latruffe N.: Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner, *J Biol Chem.* 1998; 273(27):16710-4.
106. Murphy E. J., Prows D. R., Jefferson J. R. und Schroeder F.: Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism, *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1301(3):191-8
107. Mustard J. F., Kinlough-Rathbone R. L. und Packham M. A.: Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing, *Methods Enzymol.* 1989; 169:3-11
108. Muszbek L., Haramura G., Cluette-Brown J. E., van Cott E. M. und Laposata M.: The pool of fatty acids covalently bound to platelet proteins by thioester linkages can be altered by exogenously supplied fatty acids, *Lipids* 1999; 34 (Suppl.):331-7
109. Mutanen M. und Freese R.: Fats, lipids and blood coagulation, *Curr. Opin. Lipidol.* 2001; 12:25-29
110. Nicholson A. C., Febbraio M., Han J., Silverstein R. L. und Hajjar D. P.: CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor, *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 902:128-31; discussion 131-3

111. Noy N., Donnelly T. M. und Zakim D.: Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver, *Biochemistry* 1986; 25(8):2013-21
112. Okumura T. und Jamieson G. A.: Platelet glycolocalicin. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface, *J. Biol. Chem.* 1976; 251(19):5944-9
113. Ordway R. W., Singer J. J. und Walsh J. V. Jr.: Direct regulation of ion channels by fatty acids, *Trends Neurosci.* 1991; 14(3):96-100. Review
114. Pasloske B. L. und Howard R. J.: Malaria, the red cell, and the endothelium, *Annu Rev Med.* 1994; 45:283-95
115. Phillips D. R. und Agin P. P.: Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977; 75(4):940-7
116. Poirier H., Degrace P., Niot I., Bernard A. und Besnard P.: Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP), *Eur. J. Biochem.* 1996; 238(2):368-73
117. Pravenec M. und Kurtz T. W.: Molecular genetics of experimental hypertension and the metabolic syndrome: from gene pathways to new therapies, *Hypertension.* 2007;49(5):941-52. Review
118. Ricciarelli R. und Azzi A.: Regulation of recombinant PKC alpha activity by protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A, *Arch Biochem Biophys.* 1998; 355(2):197-200
119. Richieri G. V., Anel A. und Kleinfeld A. M.: Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB, *Biochemistry* 1993; 32(29):7574-80
120. Richieri G. V. und Kleinfeld A. M.: Unbound free fatty acid levels in human serum, *J. Lipid Res.* 1995; 36(2):229-40
121. Rigotti A., Acton S. L. und Krieger M.: The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids, *J. Biol. Chem.* 1995; 270(27):16221-4
122. Roden M., Price T. B., Perseghin G., et al.: Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans, *J Clin Invest.* 1996; 97(12):2859-65
123. Salah-Uddin H., Gordon M. J., Ford I., Tandon N. N., Greaves M. und Duttaroy A. K.: Surface expression of fatty acid translocase (FAT/CD36) on platelets in myeloproliferative disorders and non-insulin dependent diabetes mellitus: effect on arachidonic acid uptake, *Mol Cell Biochem.* 2002; 239(1-2):203-11
124. Schaffer J. E. und Lodish H. F.: Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein, *Cell* 1994; 79(3):427-36

125. Schmider W., Fahr A., Voges R., Gerok W. und Kurz G.: Irreversible inhibition of hepatic fatty acid salt uptake by photoaffinity labeling with 11, 11-azistearate, *J. Lipid Res.* 1996; 37(4):739-53
126. Serrero G., Frolov A., Schroeder F., Tanaka K. und Gelhaar L.: Adipose differentiation related protein: expression, purification of recombinant protein in *Escherichia coli* and characterization of its fatty acid binding properties, *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488(3):245-54
127. Sfeir Z., Ibrahimi A., Amri E., Grimaldi P. und Abumrad N. A.: Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1997; 57(1):17-21
128. Sfeir Z., Ibrahimi A., Amri E., Grimaldi P. und Abumrad N.: CD36 antisense expression in 3T3-F442A preadipocytes, *Mol Cell Biochem.* 1999; 192(1-2):3-8.
129. Singh Ahuja H., Liu S., Crombie D. L., et al.: Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents, *Mol Pharmacol.* 2001; 59(4):765-73.
130. Silverstein R. L. und Febbraio M.: CD36 and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 2000; 11(5):483-91
131. Shrago E., Woldegiorgis G., Ruoho A. E. und DiRusso C. C.: Fatty acyl CoA esters as regulators of cell metabolism, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995; 52(2-3):163-6
132. Sorrentino D., Stump D., van Ness K., et al.: Oleate uptake by isolated hepatocytes and the perfused rat liver is competitively inhibited by palmitate, *Am. J. Physiol.* 1996; 270(2):G385-92
133. Spitsberg V. L., Matitashvili E. und Gorewit R. C.: Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland, *Eur J Biochem.* 1995; 230(3):872-8
134. Standaert M. L., Bandyopadhyay G., Sajan M. P., Cong L., Quon M. J. und Farese R. V.: Okadaic acid activates atypical protein kinase C (zeta/lambda) in rat and 3T3/L1 adipocytes. An apparent requirement for activation of Glut4 translocation and glucose transport, *J Biol Chem.* 1999; 274(20):14074-8
135. Stremmel W., Kochwa S. und Berk P. D.: Studies of oleate binding to rat liver plasma membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 112(1):88-95
136. Stremmel W., Lotz G., Strohmeyer G. und Berk P. D.: Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes, *J. Clin. Invest.* 1985; 75(3):1068-76
137. Stremmel W., Strohmeyer G. und Berk P. D.: Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986; 83(11):3584-8

138. Stump D. D., Fan X. und Berk P. D.: Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake, *J. Lipid Res.* 2001; 42:509-20
139. Su X. und Abumrad N. A.: Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction, *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20(2):72-7. Review
140. Tanaka T., Okamoto F., Sohmiya K. und Kawamura K.: Lack of myocardial iodine-123 15-(p-iodiphenyl)-3-R,S-methylpentadecanoic acid (BMIPP) uptake and CD36 abnormality--CD36 deficiency and hypertrophic cardiomyopathy, *Jpn Circ J.* 1997; 61(8):724-5
141. Tanaka T., Nakata T., Oka T., et al.: Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations, *J. Lipid Res.* 2001; 42(5):751-9
142. Tandon N. N., Lipsky R. H., Burgess W. H. und Jamieson G. A.: Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36), *J. Biol. Chem.* 1989; 264(13):7570-5
143. Tao N., Wagner S. J. und Lublin D. M.: CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails, *J. Biol. Chem.* 1996; 271(37):22315-20
144. Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J. G., Thomazy V. A. und Evans R. M.: PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL, *Cell* 1998; 93(2):241-52
145. Torra I. P., Chinetti G., Duval C., Fruchart J. C. und Staels B.: Peroxisome proliferator-activated receptors: from transcriptional control to clinical practice, *Curr. Opin. Lipidol.* 2001; 12:245-54
146. Trigatti B. L., Anderson R. G. und Gerber G. E.: Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 255(1):34-9
147. Trigatti B. L., Mangroo D. und Gerber G. E.: Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* 1991; 266(33):22621-5
148. Trotter P. J., Ho S. Y. und Storch J.: Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells, *J. Lipid Res.* 1996; 37(2):336-46
149. Turcotte L. P., Petry C., Kiens B. und Richter E. A.: Contraction-induced increase in Vmax of palmitate uptake and oxidation in perfused skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.* 1998; 84:1788-94
150. Van-Nieuwenhoven F. A., Verstijnen C. P., Abumrad N. A., et al.: Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 207(2):747-52
151. Vega M. A., Segui-Real B., Garcia J. A., et al.: Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36, *J. Biol. Chem.* 1991; 266(25):16818-24
152. Vosper H., Patel L., Graham T. L., et al.: The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages, *J Biol Chem.* 2001; 276(47):44258-65

153. Westergaard M., Henningsen J., Svendsen M. L., et al.: Modulation of keratinocyte gene expression and differentiation by PPAR-selective ligands and tetradecylthioacetic acid, *J Invest Dermatol.* 2001; 116(5):702-12
154. Yamamoto N., de-Romeuf C., Tandon N. N. und Jamieson G. A.: A resolution of reported discrepancies in the characteristics of platelet glycoproteins IV (GPIV) and IIIb (GPIIb), *Thromb. Haemost.* 1990; 63(1):97-102
155. Yanai H., Chiba H., Fujiwara H., et al.: Phenotype-genotype correlation in CD36 deficiency types I and II, *Thromb Haemost.* 2000; 84(3):436-41
156. Young S., Parker P. J., Ullrich A. und Stabel S.: Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation, *Biochem J.* 1987; 244(3):775-9
157. Zhou S. L., Stump D., Sorrentino D., Potter B. J. und Berk P. D.: Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein, *J. Biol. Chem.* 1992; 267(20):14456-61

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Julia Preiß, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung der Proteinkinase C für die Regulation des proteinvermittelten Fettsäuretransportes in humanen Thrombozyten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Julia Henriette Preiß