

**Urologische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar**

**(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)**

**Der Einfluss von unspezifischen Immunkomplexen und einigen  
genau definierten Polymeren auf cholesterolhaltige Lipoproteine -  
ein in-vitro Modellversuch**

**Christian Lorz**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Hartung
2. apl. Prof. Dr. W. Hansen

Die Dissertation wurde am 17.12.2002 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.02.2003 angenommen.

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Theoretische Grundlagen.....	3
1.1.1	Teilaspekte der Entzündungsreaktion.....	3
1.1.2	Die Plasmamikrodestabilisierung als ein möglicher kritischer Faktor in der Atherogenese ..	4
1.1.2.1	Hypothesen zur Krankheitsentstehung .....	4
1.1.3	Die Entwicklung der atherosklerotischen Plaque .....	6
1.1.4	Lymphozyten und Makrophagen.....	7
1.1.5	Immunsuppression als Folge der persistierenden Makrophagenaktivierung .....	8
1.1.6	Persistierende Makrophagenaktivierung führt zu vermehrter T-Helfer <sub>2</sub> -Expression .....	10
1.1.7	Zentrale Rolle für endotheliale NADPH-Oxidase bei der Atheroskleroseentstehung .....	11
1.1.7.1	Superoxide als second messenger.....	12
1.1.7.2	LDL-Oxidation durch NADPH-Oxidase .....	12
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	14
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	15
3.1	ELISA-Photometer .....	15
3.2	Waage .....	15
3.3	pH-Meter .....	15
3.4	Geräte .....	15
3.5	Versuchssubstanzen und Chemikalien .....	15
3.5.1	Normales Humanserum (NHS) .....	15
3.5.2	Immunkomplexe.....	15
3.5.3	Modulierende Substanzen .....	16
3.5.4	Polymere und Heteropolymere.....	16
3.6	Nachweismethoden.....	17
3.6.1	Monotest Cholesterin .....	17
3.6.2	Modifikation der Standardmessmethode .....	18
3.7	Versuchsdesign.....	19
3.7.1	Fragestellung und methodische Rahmenbedingungen .....	19
3.7.2	Versuchsplanung .....	20
3.7.3	Versuchsauswertung.....	23
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	24
4.1	Einfluss von Immunkomplexen (IC) auf die Serumstabilität in Anwesenheit des kationischen, positiv geladenen Polypeptids Lysin in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Reihenfolge der IC-Zugabe .....	24
4.1.1	Versuch 1: Das positiv geladene, basisch, hydrophile Polypeptid Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 15 000 und 30 000 Dalton .....	25
4.1.2	Versuch 2: Poly-DL-Lysin mit einem Molekulargewicht >70 000 Dalton .....	26
4.1.3	Versuch 3: Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 150 000 und 300 000 Dalton .....	27
4.1.4	Versuch 4: Das Heteropolymer Poly-Lysin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 1:1 und einem Molekulargewicht zwischen 50 000 und 150 000 Dalton.....	28
4.1.5	Versuch 5: Das Heteroploymer Poly-Lysin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 ..	29
4.1.6	Versuch 6: Das zu einem Teil positiv geladene, hydrophile und zu einem Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 1:1 .....	30
4.1.7	Versuch 7: Das zu drei Teilen positiv geladene, hydrophile und zu einem Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 3:1 .....	31

4.1.8	Versuch 8: Das zum Teil positiv geladene, zum Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15 000 Dalton .....	32
4.2	Wirkung des kationischen Polypeptids L-Lysin auf die Stabilität von Serumcholesterin bei Variation der Immunkomplexzugabe und Zusatz von Trichloressigsäure, Glutaraldehyd und Polyvinylpropylen .....	33
4.2.1	Versuch 9: Das positiv geladene Polypeptid Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 1 000–4 000 Dalton .....	33
4.2.2	Versuch 10: Das positiv geladene Polymer Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 15 000 – 30 000 Dalton .....	35
4.2.3	Versuch 11: Das positiv geladene, hydrophile Polymer Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 150 000 – 300 000 Dalton .....	37
4.2.4	Versuch 12: Das zu einem Teil positiv geladene und zu einem Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 1:1 .....	39
4.2.5	Versuch 13: Das zum Teil positiv geladene, hydrophile und zum Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin mit einem Molekulargewicht von 5000–15 000 Dalton .....	41
4.3	Versuche mit Glutamin.....	43
4.3.1	Versuch 14: Das ungeladene Polypeptid Poly N <sup>5</sup> -3-Hydroxypropyl-L-Glutamin mit einem Molekulargewicht zwischen 40 000 und 60 000 Dalton .....	43
4.3.2	Versuch 15: Das ungeladene Heteropolymer Poly-Glutamin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 und einem Molekulargewicht zwischen 20000 und 50000 Dalton .....	44
4.3.3	Versuch 16: Das zu vier Teilen ungeladene und zu einem Teil unpolar-hydrophobe Heteropolymer Glutamin-Leucin in einem Molekülverhältnis von 4:1 und einem Molekulargewicht zwischen 30 000-70 000 Dalton .....	45
4.3.4	Versuch 17: Das Heteropolymer Poly-Glutamin-Lysin-Tyrosin 6:3:1 .....	46
4.3.5	Versuch 18: Das Heteropolymer Poly-Glutamin-Alanin 6:4 mit einem Molekulargewicht zwischen 20 000 und 50 000 Dalton .....	47
4.4	Versuche mit Glutaminsäure .....	48
4.4.1	Versuch 19: Das negativ geladene, saure Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht von 600 Dalton .....	48
4.4.2	Versuch 20: Das negativ geladene, saure Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 2 000 und 15 000 Dalton .....	49
4.4.3	Versuch 21: Das Polypeptid Poly L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 50 000-100 000 Dalton .....	50
4.5	Weitere Versuche .....	51
4.5.1	Versuch 22: Das basisch-polare Polypeptid Poly L-Histidin mit einem Molekülgewicht zwischen 15 000-30 000 Dalton .....	51
4.5.2	Versuch 23: Das ungeladene, hydrophobe Polypeptid Poly-L-Tyrosin mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 40 000 Dalton .....	52
4.5.3	Versuch 24: Das Heteropolymer Poly-Ornithin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 .....	53
4.6	Versuchsaufbau zur Resuspension bereits präzipitierter Immunkomplex-Lipoproteinvesikel .....	54
4.6.1	Versuche mit der zur mittleren Geschwindigkeitsklasse gehörigen Präzipitiersubstanz Poly-L-Arginin-hydrochlorid mit einem Molekulargewicht zwischen 70 000 und 100 000 Dalton und einem pH-Optimum von 5 .....	55
4.6.1.1	Versuch 25: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Ornithin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton .....	56
4.6.1.2	Versuch 26: Resuspensionspartner: Das ungeladene, polare Polypeptid Poly-L-Asparagin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton .....	57
4.6.1.3	Versuch 27: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Hydroxyx-Prolin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 20000 Dalton .....	58

4.6.1.4	Versuch 28: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-DL-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton .....	59
4.6.1.5	Versuch 29: Resuspensionspartner: Das unpolare, hydrophobe und optisch inaktive Polypeptid Poly-L-Glycin mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 5000 Dalton .	60
4.6.1.6	Versuch 30: Resuspensionspartner: Das negativ geladene, saure Polypeptid Poly-D,L-Aspartat mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 10000 Dalton .....	61
4.6.1.7	Versuch 31: Resuspensionspartner: Das hydrophob-unpolare Polypeptid Poly-L-Tryptophan mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton .....	62
4.6.2	Versuche mit der zur langsamen Geschwindigkeitsklasse gehörigen sauren,negativ geladenen Präzipitiersubstanz Poly-L-Asparagin mit einem pH-Optimum von 5.....	63
4.6.2.1	Versuch 32: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Ornithin Hydrobromid mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton.....	64
4.6.2.2	Versuch 33: Resuspensionspartner: Das saure, negativ geladene Polypeptid Poly-L-Asparagin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton .....	65
4.6.2.3	Versuch 34: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-Hydroxy-Prolin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 20000 Dalton .....	66
4.6.2.4	Versuch 35: Resuspensionspartner: Das hydrophobe,ungeladene Polypeptid Poly-D,L-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton.....	67
4.6.2.5	Versuch 36: Resuspensionspartner: Das hydrophobe, unpolare und optisch inaktive Polypeptid Poly-L-Glycin mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 5000 Dalton .	68
4.6.2.6	Versuch 37: Resuspensionspartner: Das negativ geladene Polypeptid Poly-( $\alpha,\beta$ )-DL-Asparaginsäure .....	69
4.6.2.7	Versuch 38: Resuspensionspartner: Das unpolar-hydrophobe Polypeptid Poly-Tryptophan mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton .....	70
4.6.3	Versuche mit der zur schnellen Geschwindigkeitsklasse gehörigen Präzipitiersubstanz Hauptsubstanz Poly-Arginin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 und einem pH-Optimum von 7.....	71
4.6.3.1	Versuch 39: Resuspensionspartner: Das hydrophobe, unpolare Polypeptid Poly-D,L-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton .....	72
4.6.3.2	Versuch 40: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Ornithin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton .....	73
4.6.3.3	Versuch 41: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 15000 Dalton .....	74
4.6.3.4	Versuch 42: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-Glutamin-Tyrosin in einem Molekularverhältnis von 1:1.....	75
4.6.3.5	Versuch 43: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin mit einem Molekulargewicht zwischen 40000 und 60000 Dalton .....	76
4.6.3.6	Versuch 44: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure.....	77
4.6.3.7	Versuch 45: Resuspensionspartner: Das Polpeptid Poly-L-Lysin succinyliert mit einem Molekülgewicht zwischen 15000 und 30000 Dalton .....	78
4.6.3.8	Versuch 46: Resuspensionspartner: Das Heteropolymer Poly-Glutamin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 6:4 und einem Molekulargewicht zwischen 20000 und 50000 Dalton .....	79
4.6.3.9	Versuch 47: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Tyrosin mit einem Molekülverhältnis zwischen 10000 und 40000 Dalton .....	80
4.6.3.10	Versuch 48: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 15000 Dalton .....	81
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>

# **1 Einleitung**

Das Immunsystem setzt sich aus annähernd einer Trillion spezialisierter Zellen zusammen und bedient sich unterschiedlicher Strategien, um die Erhaltung der Individualität und Integrität, die Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“, sowie die Abwehr und Elimination fremder Organismen oder toxischer Substanzen zu gewährleisten[21].

Der Apparat der immunkompetenten Zellen besteht aus B- und T-Lymphozyten, welche zusammen mit den antigenpräsentierenden Zellen (APC), zu denen Monozyten und Makrophagen zählen, den komplexen und lebenswichtigen Aufgaben der Immunabwehr nachkommen. Unterstützt werden sie dabei u.a. von dendritischen Zellen, Endothelzellen sowie den regulierend eingreifenden akzessorischen Zellen mit ihren löslichen Mediatoren[42].

Zu Beginn jeder Immunantwort stehen die antigenpräsentierenden Zellen, die ein erkanntes Allergen mit den zu den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) gehörenden Humanleucocyte-antigens (HLA) der Klasse II prozessieren, um sie für andere immunkompetente Zellen identifizierbar und angreifbar zu machen. Jeder Lymphozyt trägt ein Rezeptormolekül auf seiner Oberfläche, welches an ein so opsonisiertes Fremdanigen binden kann. Nach einmaligen Kontakt mit einem von den APC präsentierten Antigen entwickeln sich über mehrere Differenzierungs- und Teilungsschritte aus einer einzelnen Mutterzelle eine Vielzahl identischer, für ein bestimmtes Antigen zuständiger Zellen, die auch als Klon bezeichnet werden[2]. Diese Zellpopulation attackiert nun entweder durch direkten zellvermittelten T-Zellen-Angriff oder via Sekretion von durch B-Zellen produzierte Antikörper den erkannten Eindringling und schützt den Körper so vor weiterem Schaden[4]. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung von Gedächtnis-Zellen, die ebenfalls für jeweils ein potentiell Antigen spezifisch sind. So ist das System der Immunabwehr in der Lage, auf nahezu unbegrenzt viele Variationen chemischer Detergenzien und mikrobiologischer Organismen zu antworten.

Die für unsere Untersuchungen besonders interessanten Immunkomplexe entstehen durch Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein Antigen[42]. Bisher bekannte Immunkomplex-Krankheiten sind durch die Ablagerung dieser Strukturen in Blutgefäßen, besonders an deren Basalmembran, oder durch die Anwesenheit löslicher Komplexe im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten charakterisiert [48].

Die deponierten Komplexe rufen im wechselnden Ausmaß eine lokal entzündliche Reaktion hervor, die durch Komplementaktivierung, Granulozytenenzyme und durch die Immunkomplexe selbst verursacht wird. Zusätzlich kann es zu einer örtlichen Aktivierung des Gerinnungssystems kommen, wobei sich u.U. Fibrin bildet und Mikrothromben entstehen[42].

Die Krankheitsbilder treten transitorisch (z.B. Serumkrankheit, postinfektiöse Vaskulitis, Glomerulonephritis), in Schüben oder chronisch in Erscheinung. Zirkulierende, lösliche Immunkomplexe bewirken oft vaskulitische Veränderungen, wie sie bei der immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis, der Periarteriitis nodosa, der Überempfindlichkeitsvaskulitis und der Riesenzellarteriitis zu finden sind. Auch Autoimmunreaktionen wie der Lupus erythematoses disseminatus, die gemischte Kryoglobulinämie, die chronisch rheumatoide Arthritis gehören diesem Formenkreis an und sind auf Antigen-Antikörper-Komplexe zurückzuführen[5].

Sowohl im Serum als auch in den atheromatösen Läsionen von Patienten mit manifester Atherosklerose konnten Immunkomplexe aus (low-density-lipoprotein - Anti-LDL) oder den modifizierten (oxydated-low-density-lipoproteins - Anti-ox-LDL) nachgewiesen werden[36, 58].

Grundlage dieser Arbeit ist die Hypothese, dass schon alleine die Anwesenheit unspezifischer Immunkomplexe und cholesterolhaltiger Lipoproteine zu einer lokalen Destabilisierung des Blutplasmas führen und so die Progression der atheromatösen Plaquebildung und den Ablauf einer chronischen Entzündungsreaktion unterstützen. Die dabei involvierten Entzündungszellen würden demnach in dauerhaft aktiviertem Zustand physiologische Regelkreise in ein Ungleichgewicht bringen und so dem Fortschreiten degenerativer Krankheiten Vorschub leisten.

In dieser Dissertation sollen die Auswirkungen von in ihrer Struktur bekannter Polypeptide auf ein in-vitro-Modellsystem untersucht werden. Dabei steht die Identifizierung von Substanzen im Vordergrund, welche Plasmadestabilisierungsprozesse entweder beschleunigen oder verhindern können. Im nachfolgenden theoretischen Teil wird die Atherosklerose als Beispiel für eine Erkrankung gewählt, deren bisher bekannte Entstehungsfaktoren um eine mögliche Beteiligung der Immunkomplexe zu erweitern wären.

## **1.1 Theoretische Grundlagen**

### **1.1.1 Teilaspekte der Entzündungsreaktion**

Eine Entzündung wird durch mechanische (z.B. Druck, Fremdkörper), physikalische (Kälte, Wärme, ionisierende Strahlen), chemische (Säuren, Laugen), toxische (bakterielle Endo- und Exotoxine, Harnstoff bei Urämie), mikrobiologische (Viren, Bakterien, Pilze) und immunologische Faktoren (zirkulierende Immunkomplexe) ausgelöst.

Alle Entzündungsreize führen zunächst zu einem Zellerfall im Rahmen einer lokalen Gewebsnekrose, in deren Folge verschiedene Mediatoren (wie z.B. Zytokine) freigesetzt werden[42]. Ziel der Entzündungsreaktion ist die Inaktivierung dieses Reizes und die Wiederherstellung des dabei zugrundegegangenen Gewebes[42]. Dafür müssen humorale und zelluläre Bestandteile des Immunsystems an einen potentiellen Infektionsherd transportiert werden, wobei sich im Wesentlichen folgende Vorgänge abspielen:

1. Eine erhöhte Blutzufuhr zum Infektionsort.
2. Eine erhöhte Kapillarpermeabilität durch Retraktion der Endothelzellen. So kann das Endothel von Molekülen passiert werden, die normalerweise zu groß dazu wären. Antikörpern, Komplementfaktoren und Molekülen anderer Plasmaenzymssysteme ist es so möglich, zum Ort der Entzündung vorzudringen.
3. Leukozyten, speziell polymorphkernige neutrophile Leukozyten und in geringerem Umfang Makrophagen, treten aus den Kapillaren in das umgebende Gewebe aus. Dort wandern sie durch Chemotaxis auf den Infektionsherd zu[42].
4. Prostaglandine werden durch das Enzym Zyklooxygenase aus Arachidonsäure unter dem Einfluss von Mastzellen, basophilen Leukozyten und Thrombozyten durch Aktivierung von Phospholipase A2 gebildet.
5. Basophile Granulozyten und Mastzellen setzen Histamin frei und aus Plasmaglobulin wird durch das Enzym Kallikrein Bradykinin gebildet[41].

Die in Punkt 4. und 5. aufgeführten Entzündungsmediatoren führen zu einer Störung der Mikrozirkulation durch Vasodilatation in den Arteriolen und Kapillaren, später auch in postkapillären Venolen.

Aufgrund der Vasodilatation kommt es zunächst zu einer Strömungsverlangsamung im Gefäßbett des Entzündungsbereiches, später dann zu einer Stase. So kann die weitere Verbreitung des Erregers auf dem Blutweg verhindert werden[42].



Da die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr sowie der Abtransport von metabolischen Schlacken und CO<sub>2</sub> in diesen Gebieten unterbrochen ist, fällt der pH-Wert im umgebenden Gewebe ab, es resultiert eine lokale Azidose[41].

Der genaue pH-Wert in chronisch entzündlichem Gewebe ist nicht bekannt, in Abszessen und in der Peritonealflüssigkeit von Patienten mit einem intraabdominellen Abszess sind pH-Werte zwischen 6,0 und 6,8 gemessen worden[51]. Aufgrund dieser Erkenntnisse erschien es sinnvoll, die in-vitro-Versuche bei niedrigeren pH-Werten als dem physiologischen von 7,4 durchzuführen, um damit die bei einer Entzündung auftretenden Bedingungen zu simulieren. Die oben erwähnten Zytokine spielen beim Signalaustausch zwischen den Zellen eine wichtige Rolle. In den Anfangsstadien werden Interleukin-1 und Interleukin-6 durch Zellen des betroffenen Gewebes freigesetzt. Lymphozyten und mononukleäre Zellen erscheinen durch diesen chemotaktischen Reiz angelockt am Ort der Entzündung, werden durch Antigene aktiviert und setzen nun ihrerseits wieder Zytokine frei (Interleukin-1, Interleukin-4, Tumor-Nekrose-Faktor, Interferon  $\gamma$ ), die die Einwanderung von weiteren Zellen durch ihre Wirkung auf das lokale Endothel verstärken[43].

Die Anwesenheit von T-Lymphozyten und Makrophagen, proliferierenden Mesenchymzellen, das Auftreten von Fibrose und Gewebnekrosen und der Nachweis von abgelagerten Immunkomplexen in der humanen atheromatösen Läsion deuten auf das Vorliegen einer chronischen Entzündungsreaktion hin.

## **1.1.2 Die Plasmamikrodestabilisierung als ein möglicher kritischer Faktor in der Atherogenese**

### **1.1.2.1 Hypothesen zur Krankheitsentstehung**

Die WHO definiert die Atherosklerose als

„eine variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien (zu unterscheiden von Arteriolen), die aus einer fokalen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, fibrösem Gewebe und Kalkablagerung besteht und mit Mediaveränderungen einhergeht“[35].

Im 19. Jahrhundert wurden zwei Hypothesen zur Erklärung der Pathogenese der Atherosklerose favorisiert: die **Inkrustationshypothese** von Rokitansky, nach der die Intimaverdickung aus Fibrinablagerungen mit anschließender Organisation durch Fibroblasten resultiert und an die sich eine Lipidakkumulation anschließt.

Die **Lipidhypothese** von Virchow postuliert eine Lipidakkumulation in der Arterienwand durch verstärkte Lipidablagerungen aus dem Blut[10]. Sie geht dabei von der Vorstellung aus, dass mit der Höhe der Cholesterinkonzentration im Blut unmittelbar und kausal das Risiko der Entwicklung einer Arteriosklerose verbunden ist[12]. Die Lipide des Blutes können nach dieser Theorie auch ohne Vorliegen weiterer Faktoren eine Arteriosklerose auslösen und unterhalten. Diese Vorstellung wird durch zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen gestützt. Eine Vielzahl epidemiologischer Untersuchungen hat auch beim Menschen eine Assoziation zwischen den Blutspiegeln von Cholesterin und anderen Lipiden und der Manifestation atherosklerotischer Gefäßerkrankungen nachgewiesen[12]. Durch eine medikamentöse Senkung des Cholesterinspiegels kann die Progression der koronaren Herzkrankheit reduziert und die Anzahl koronarer Ereignisse wie Myokardinfarkt oder plötzlicher Herztod vermindert werden[54]. Die Hyperlipoproteinämie ist der stärkste Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit[55]. So kommt es zuerst zu funktionellen Beeinträchtigungen und nachfolgend zu morphologisch fassbaren Endothelzellschädigungen[12].

Ross fasste beide Theorien in der sogenannten **Response-to-injury-Hypothese** (Verletzungstheorie) zusammen[10, 46].

Die **Monozytenhypothese** legt auf der Grundlage eines einzelnen, in den Läsionen gefundenen Isoenzym nahe, dass die Intimaproliferation wie bei einem benignen Tumor aus der Vermehrung einer einzelnen, individuellen glatten Muskelzelle resultiert[10, 19].

Benditt und Benditt konnten die Monoklonalität von glatten Muskelzellen in arteriosklerotischen Läsionen nachweisen[3]. Die Auslösung des proliferativen Prozesses könnte u. a. durch eine Virusinfektion (z.B. Zytomegalieinfektion) erfolgen[12]. Der von den Autoren als fokale klonale Sequenz bezeichnete Mechanismus beinhaltet, dass die glatten Muskelzellen der Intima normalerweise der Feedbackkontrolle durch die angrenzende Media unterliegen, indem die glatten Muskelzellen Mitoseinhibitoren bilden. Mit zunehmenden Alter treten vermehrt Störungen dieses Feedbackkontrollsystems auf, da diese Kontrollfunktion mit zunehmendem Alter der Zellen zugrunde gehen[19].

Die **lysosomale Hypothese** legt dar, dass eine alterierte Lysosomenfunktion zur Entstehung der Atherosklerose beitragen kann. Die erhöhte Speicherung von Cholesterinestern in der glatten Muskelzelle der Arterien könnte mit dem relativen Mangel an Aktivität der lysosomalen Cholesterinesterhydrolyase zusammenhängen[19].

Die Response-to-injury-Theorie wird am breitesten für die Atheroskleroseentstehung akzeptiert, da sie mit einer Vielzahl experimenteller Beweise übereinstimmt[18, 19]. Demnach sind die die Intima auskleidenden Endothelzellen und möglicherweise auch die darunter liegenden glatten Muskelzellen wiederholten oder kontinuierlichen Schädigungen durch chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse ausgesetzt[10, 18, 46]. Die geschädigten Zellen induzieren eine spezifische, chronische Entzündungsreaktion mit nachfolgender fibroproliferativer Antwort.

### **1.1.3 Die Entwicklung der atherosklerotischen Plaque**

Die Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque ist ein komplexer Prozess, an dessen Beginn die endotheliale Dysfunktion steht. Sie wird durch Faktoren wie Hypercholesterinämie, Rauchen, arterielle Hypertension, Hyperhomocysteinurie und gestörten Glukosestoffwechsel und weiteren Faktoren wie mikrobiologische Ursachen, genetische Determination, Alter, Geschlecht und Bewegungsmangel ausgelöst und drückt sich in erhöhter Endothelpermeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile aus[46].

Unter den beteiligten Mediatoren finden sich Stickstoffmonoxid (NO), platelet derived growth factor (PDGF), Prostacycline, Angiotensin II und Endothelin[38].

Durch vermehrte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie VCAM 1, ICAM 1 und verschiedener Selektine kommt es zur Migration von Leukozyten und Makrophagen in den subendothelialen Raum[33, 57].

Der nächste Entwicklungsschritt beinhaltet, stimuliert durch PDGF und Tumor-Growth-Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), die Einwanderung von glatter Gefäßwandmuskulatur[49], die Aktivierung von T-Lymphozyten durch Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 2[31]. Anschließend kommt es zur Schaumzellbildung aus hyperaktivierten Makrophagen, welche durch oxidiertes Low-density-lipoprotein (LDL), Makrophage-colony-stimulating-faktor (MCSF), TNF $\alpha$  und Interleukin 2 (IL-2) ausgelöst wird[47]. Thromboxan A<sub>2</sub> und tissue-factor verstärken zusätzlich die Blutplättchenaggregation[25]. Diese hoch aktiven Substanzen lösen eine lokale Entzündungsreaktion aus und initiieren Gewebeschäden, die sich zum Beispiel in einer Endothelverletzung manifestieren können.

Die Zellen der glatten Gefäßwandmuskulatur bilden eine fibröse Kappe, welche der Plaque einerseits mechanische Stabilität verleiht und andererseits die lipidreiche thrombotisch wirksame Kernzone vom Gefäßlumen und damit dem zirkulierenden Blut separiert.

Ob eine solche Läsion unverletzt und damit stabil bleibt, oder rupturiert und zu einer Thrombose führt, die sich im klinischen Bild einer instabilen Angina pectoris äußern kann, hängt von unterschiedlichen Faktoren ab, deren wichtigster die Zusammensetzung des Kernbereichs ist[15].

Durch die Einwanderung und Aktivierung von Makrophagen kommt es zur Ausdünnung der Kappe, da Makrophagen Metalloproteinase und andere proteolytische Enzyme freisetzen. Getriggert werden sie dabei von an Entzündungsreaktionen beteiligten Zellen wie zum Beispiel den T-Lymphozyten. Stabile Plaques haben eine sehr dicke fibröse Kappe, einen kleinen Lipidkern und beinhalten weniger Entzündungszellen. Im Gegensatz dazu finden sich bei den vulnerablen Läsionen ein hoher Lipidgehalt im Kernbereich, zahlreiche Entzündungszellen mit den entsprechenden Mediatoren und eine dünne kollagenarme fibröse Kappe, die glatte Gefäßwandmuskulatur enthält[26].

Nach diesem Überblick über die Krankheitsentstehung soll im Folgenden auf einige aktuelle Erklärungsansätze, die das Immunsystem in die Ätiologie miteinbeziehen eingegangen werden:

#### **1.1.4 Lymphozyten und Makrophagen**

In allen Stadien der atherosklerotischen Läsion wurden Monozyten und T-Lymphozyten gefunden[9]. Als sekundäre Antwort auf die Endothelverletzung werden oben genannte Adhäsionsmoleküle exprimiert, zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten heften sich daraufhin an das Endothel[32] und wandern in den subendothelialen Raum[7]. In der Gefäßwand differenzieren sich die Monozyten entweder in phagozytotische Scavenger-Zellen, was letztendlich zur Schaumzellbildung führt, oder in aktivierte Makrophagen, die Zytokine ausschütten und Lipoproteine enzymatisch oder durch Oxidation modifizieren[8, 30]

Die sogenannten „fatty-streaks“ sind Hauptbestandteil der frühen Läsion. Die hier gefundenen Zellen des Immunsystems, T-Zellen und Makrophagen, liegen in einem Mengenverhältnis von circa 1:8 vor[29].

Bei Betrachtung der T-Zell-Subpopulationen findet man in dieser Phase häufiger zytotoxische  $CD_8^+$ -Suppressorzellen als die  $CD_4^+$ -T-Helfer-Zellen[50]. Die verschiedenen Zelltypen produzieren signifikante Mengen der Zytokine Interleukin 1(IL-1), IL-6, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ), Interferon  $\gamma$  ( $INF\gamma$ ) und IL-2 zusammen mit Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF`s).

Durch dieses komplexe Werk zellulärer Interaktionen werden die entsprechenden Zielzellen durch autokrine oder parakrine Mechanismen stimuliert.

Als Beispiel soll die Aktivierung von Makrophagen durch T-Zellen mittels  $\text{IFN}\gamma$  gelten[11]. Die so aktivierten Makrophagen produzieren IL-12, was wiederum die T-Zellen stimuliert,  $\text{IFN}\gamma$  in den Blutstrom abzugeben. Eine solche Zytokin-basierte Kettenreaktion kann die Zellakkumulation in der Läsion verstärken. In frühen Stadien kann jedoch durch  $\text{TGF}\beta$  und IL-1 inhibitorisch eingegriffen werden und es entsteht ein Gleichgewicht zwischen den gegensätzlichen Mechanismen.

### **1.1.5 Immunsuppression als Folge der persistierenden Makrophagenaktivierung**

Wie oben beschrieben, fördern die durch Hypercholesterinämie in der Gefäßwand akkumulierten LDL-Partikel nach ihrer chemischen Modifikation zu oxLDL die Aktivierung von Endothelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten, was zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion führt[14, 52].

Die angesteuerten Zellen exprimieren Adhäsionsmoleküle und produzieren Sauerstoffradikale. Dieser Mechanismus führt zum weiteren Anstieg des oxLDL-Spiegels und zu vermehrtem Auftreten von immunkompetenten Zellen in der Arterienwand[39].

Die T-Zellen erkennen die oxLDL-Epitope der antigenpräsentierenden Zellen und initiieren eine Immunantwort, wie durch zahlreiche knockout-Tierversuche und Untersuchungen an Menschen nachgewiesen wurde[53]. Es werden sowohl IgM- als auch IgG-Antikörper produziert. Die Makrophagen beginnen oxLDL über ihren Scavenger-Rezeptor aufzunehmen und verwandeln sich nach Erschöpfung dieses Eliminationsweges schließlich in Schaumzellen[23]. Der Scavenger-Mechanismus unterliegt keiner negativen Rückkopplung und bedingt so das Zugrundegehen der phagozytierenden Zellen, da sie das im Überfluss vorliegende Substrat so lange aufzunehmen versuchen, bis ihr eigener Stoffwechsel mangels Weiterverarbeitung zum Erliegen kommt.

Die teilweise unbekannt Ätiologie der Atherosklerose lässt die Hypothese zu, dass der eigentlichen Krankheitsauslösung eine chronische Immunsuppression vorausgeht.

Der Auslöser dieser Suppressionsphase kann entweder ein bakterieller oder viraler Infekt sein[37], ein zusätzlicher Faktor liegt in der Aktivierung von pathogenspezifischen  $\text{T}_4$ -Helferzellen und B-Memory-Zellen. In Folge der infektbedingt länger anhaltenden Unterdrückung der normalen Immunfunktion kann es durch die Suppression der T-Helfer-Zellfunktion zur „Ausverdünnung“ der Lymphokine im Plasma, und somit u.a. zur gestörten Funktion bzw. verlangsamten Nachrekrutierung der Suppressor-T-Zellen kommen[40].

Unter den Suppressor-T-Zellen befinden sich Subpopulationen, deren Funktion die ständige Überwachung der Ausbildung von T<sub>4</sub>- und Plasmazellen ist. Da es sich hierbei um einen dynamischen Prozess handelt, der eine Mindestzahl an kontrollierenden Suppressor-Zellen voraussetzt, kann eine gestörte Funktion in Form eines verlangsamten Nachschubes dieser Kontrollzellen eine Aktivierung der miteinander kooperierenden T<sub>4</sub>- und B-Gedächtniszellen und so eine oligoklonale Produktion von autoantigen- und pathogenspezifischen Antikörpern zur Folge haben.

Solche Antikörper finden beispielsweise in oxLDL ihren Partner, was schließlich zu erhöhten Immunkomplex-Plasmaspiegeln führt.

Ein weiterer Mechanismus, der letztendlich zum Anstieg der IC-Plasmaspiegel führt, ist in einer durch persistierende Makrophagenaktivierung bedingten lokalen Hypersekretion von Zytokinen oder durch Hypercholesterinämie getriggerte vermehrte Expression von T-Helfer-Zellen zu sehen[59].

Beide Subpopulationen der T-Helfer-Zellen spielen also eine wichtige Rolle in der Atherogenese. Die Sekretion von IFN $\gamma$ , ein makrophagenaktivierendes und proinflammatorisch wirksames Zytokin, scheint dabei besonders herausragend zu sein:

es stimuliert Makrophagen zur Zytokin- und Sauerstoffradikalproduktion und fördert ihre Metalloproteinaseexpression. Endothelzellen fangen an, Adhäsionsmoleküle zu bilden und die Kontraktilität der glatten Gefäßwandmuskulatur wird reduziert, während die Fibrinogenese gefördert wird.

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen sowohl der IFN $\gamma$ -Rezeptor als auch der Apo E-Rezeptor fehlt, deutlich schwächere Tendenzen aufweisen, Atherosklerose zu entwickeln, als Tiere, denen nur der Apo E-Rezeptor fehlt. Dies lässt auf einen deutlichen Einfluss von IFN $\gamma$  auf die Atherogenese schließen.

IFN $\gamma$  wird von Th<sub>1</sub>-Zellen produziert, während die Th<sub>2</sub>-Subpopulation vornehmlich IL-4, IL-5, IL-10 und andere Zytokine sezerniert, welche die B-Zell-Aktivität fördern.

Den unterschiedlichen makrophagenaktivierenden Signalen ist gemeinsam, dass sie direkt oder indirekt zur (Hyper-) Sekretion von Prostaglandinen (PGE1 / PGE2) führen, die auf alle bisher untersuchten Leukozyten-Subpopulationen immunsuppressiv wirken[24].

Die persistierenden IC, aber auch die hypersezernierten Zytokine (z.B. IL-1, IL-2) stellen eine Art endogenes Dauersignal dar, welches die Makrophagen zu Suppressor-Monozyten umprogrammiert. Derart umprogrammierte mononukleäre Phagozyten verlieren die Fähigkeit, auf neue antigene Reize zu antworten und hemmen außerdem die Funktionen anderer immunkompetenter Zellen[24].

### **1.1.6 Persistierende Makrophagenaktivierung führt zu vermehrter T-Helfer<sub>2</sub>-Expression**

Die Phagozyten des menschlichen Körpers verfügen in aktivierter Form über drei Möglichkeiten um auf für sie spezifische Antigene zu antworten.

Aufgrund einer zunächst subklinisch verlaufenden persistierenden Entzündungsreaktion kommt es zu einem lokalen Sauerstoffmangel für die Atmungskette der beteiligten Phagozyten, sowie zur Ansäuerung des sie umgebenden Milieus [51].

Das glykolytisch bereitgestellte Reduktionsäquivalent  $\text{NADP}^+$  dient zur enzymatischen Bildung (NADPH-Oxidase) von Superoxidanionradikalen [20]. Diese Superoxidanionradikale werden durch das Enzym Dismutase via Zelloxidation in Wasserstoffperoxid überführt.

Als Folge des erhöhten  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegels verlagert sich der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ -B in den Zellkern[28]. Durch Bindung an Enhancer/Silencerregionen kommt es zu einer erhöhten Expression von intrazellulären Zelladhäsionsmolekülen (ICAM) und endothelartigen Zelladhäsionsmolekülen (ELAM-1,) die für eine verstärkte Rekrutierung von phagozytosefähigen Zellen aus der Blutbahn in die betroffene Zelle verantwortlich sind. Zusätzlich kommt es zu einem Verbrauch des ebenfalls glykolytisch bereitgestellten Energieträgers ATP[16].

ATP dient einerseits zur eigenen Energieversorgung, sowie als Substrat für die Synthese von cAMP durch die in der Zellmembran lokalisierte Adenylatcyclase[20].

Die dritte Möglichkeit kann als direkter Angriff von immunkompetenten Zellen auf erkannte Antigene, die Phagozytose, beschrieben werden.

cAMP dient als second messenger in einer Signaltransduktionskette. Schlüsselreaktionen sind hierbei die Aktivierung der Phosphatidylinositol-Kinase, sowie einer Phospholipase. Durch die Kinase wird der Inositolrest phosphoryliert.

Eine durch ein G-Protein stimulierte Phospholipase spaltet dann das Lipid zu Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). Sowohl IP3 als auch DAG sind an der Signaltransduktion beteiligt. IP3 bewirkt einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und DAG stimuliert eine Proteinkinase. Durch Bindung von drei IP3-Molekülen an einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal des endoplasmatischen Retikulums wird dieser geöffnet.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wirken als Botenstoff oft nicht direkt, sondern über die Bindung an Calmodulin, welches wiederum eine Proteinkinase aktiviert[22]. Hierdurch wird die Expression von Transkriptionsfaktoren, bzw. ihre Aktivierung oder Inhibierung gesteuert.

Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Alternativweg kann mittels DAG eingeschlagen werden. Auch hier wirkt eine Proteinkinase aktivierend auf die Expression von Transkriptionsfaktoren. Diese Faktoren binden an Enhancer/Silencer (spezifische Regulationselemente des eukaryotischen Genoms) und beeinflussen mittels Bindung von Zytokinen, u.a.  $\text{IFN}\alpha$  bzw.  $\text{IFN}\gamma$  die Expression von MHC I/MHC II.

Hierbei induziert das von den Leukozyten gebildete  $\text{IFN}\alpha$  die Bildung von MHC I, was wiederum zu einer Steigerung der Lymphozytenaktivität führt. Das von T-Lymphozyten und Killerzellen gebildete  $\text{IFN}\gamma$  bildet MHC II. Eine Steigerung der Makrophagenaktivität ist die Folge.

Bei länger andauernder Aktivierung der Makrophagen kommt es zu einer Verlagerung der Zytokinproduktion in Richtung  $\text{IFN}\alpha$ . Der  $\text{IFN}\alpha$ -Überhang bedingt eine anhaltende Lymphozytenaktivierung, die letztendlich durch vermehrtes Auftreten von Antikörpern bzw. daraus entstehenden Immunkomplexen manifest wird[24].

Dabei spielt die Hypercholesterinämie eine bedeutende Rolle, da die beteiligten T-Helferzellen unterschiedliche Cholesterinresistenzen besitzen. Während T-Helfer<sub>1</sub>-Zellen nur gering angestiegene Cholesterinspiegel tolerieren können, persistieren T-Helfer<sub>2</sub>-Zellen auch bei höheren Cholesterinplasmaspiegeln. Als Ergebnis können in atherosklerotischen Plaques neben  $\text{IgG}_1$ -Autoantikörpern gegen modifiziertes LDL auch erhöhte T-Helfer<sub>2</sub>-Zytokinspiegel nachgewiesen werden[13]. Die B-Lymphozytenfraktion wird also einerseits durch die dauerhaft aktivierten Makrophagen und die von ihnen sezernierten Zytokine (vermehrt MHC I), andererseits durch die bei der Atherosklerose typischen erhöhten Cholesterinplasmaspiegel aktiviert, Antikörper gegen modifiziertes LDL zu produzieren. Diese Antikörper führen zur Bildung von Immunkomplexen, die in den atheromatösen Plaques nachgewiesen werden konnten.

### **1.1.7 Zentrale Rolle für endotheliale NADPH-Oxidase bei der Atheroskleroseentstehung**

Das Immunsystem stattet seine neutrophilen Zellen, Monozyten und Makrophagen mit der Fähigkeit zur Superoxidproduktion aus[6]. Die entstehenden freien Sauerstoffradikale werden hauptsächlich zu Abwehr von Bakterien benötigt, tragen aber auch zur Genese und Progression der Atherosklerose bei[34].

Der Hauptvertreter dieser Superoxidproduzenten ist die NADPH-Oxidase. NADPH-Oxidase reduziert molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zu Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ). Diese freien Radikale sind äußerst kurzlebige und reaktionsfreudige Verbindungen und führen innerhalb von Phagosomen über



eine Reihe von nichtenzymatischen Folgereaktionen zu ungehemmt oxidativem Abbau des phagozytierten Materials. Analoge Mechanismen sind bei der durch das Radikal vermittelten Lipidperoxidation bekannt[56]. Schließlich konnte man NADPH-Oxidase auch in Endothelzellen nachweisen[27].

Hohe LDL Serumspiegel führen zu einem Anstieg der Aktivität von endothelialer NADPH-Oxidase und damit zu einer Zunahme von reaktiven Sauerstoffradikalen (reactiv oxygen species; ROS) [17, 34]. Da solche Radikale in der Pathophysiologie der Atherosklerose entscheidend mitwirken, stellt sich die Frage, ob der vermehrten Aktivität von NADPH-Oxidase nicht eine größere Rolle zukommt, als bisher vermutet.

#### **1.1.7.1 Superoxide als second messenger**

Superoxide (ROS) wurden bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen als second messenger gefunden[44]. Dazu gehören Teilabläufe bei der Apoptose, Proliferation und Kontraktion von glatter Gefäßmuskulatur trotz der Anwesenheit des stark relaxierenden Stickstoffmonoxids (NO)[45] und Regulation des Endothelstoffwechsels: hohe LDL-Spiegel bedingen hier eine Zunahme der Endozytose[17], die Adhärenz von Monozyten an die Endothelzellschicht und die Thrombozytenaggregation nehmen zu.

#### **1.1.7.2 LDL-Oxidation durch NADPH-Oxidase**

Die subendotheliale Schaumzellakkumulation ist ein früher Indikator in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Schaumzellen entstehen durch die unregelmäßige Aufnahme von LDL durch Makrophagen und Monozyten, deren LDL-Rezeptorenzahl aufgrund der intrazellulären Cholesterolkonzentration herunterreguliert wurde. Das chemisch modifizierte und oxidierte LDL (ox-LDL) wird über den scavenger-pathway aufgenommen.

Monozyten, Makrophagen, Zellen der glatten Gefäßwandmuskulatur und Endothelzellen können in-vitro alle LDL oxidieren, wobei diese Reaktion in Makrophagen von der NADPH-Oxidase abhängig ist. Ein ähnlicher Zusammenhang wird bei den restlichen Zelltypen vermutet.

Endothelzellen besitzen eine eigene funktionelle NADPH-Oxidase, was zu der Vermutung führt, dass LDL auch auf dem Weg durch die Endothelzellschicht von Blutgefäßen modifiziert werden kann.

Das LDL kommt auf seinem Weg durch die Gefäßwand mittels Transzytose mit ROS in Kontakt, die von der endothelzellspezifischen NADPH-Oxidase generiert wurden.

Ebenso vermutet man den Einfluss weiterer oxidationsfördernder Faktoren wie z.B.  $\text{Cu}^{2+}$  im intrazellulären Milieu. Das so entstehende ox-LDL könnte die Hauptursache für die Pathogenese der Schaumzellen darstellen[28].

Die o.g. Einzelmechanismen des Immunsystems tragen alle auf direktem oder indirektem Weg zu einer Steigerung der Immunkomplexbildung bei. Diese Komplexe wirken entweder durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften destabilisierend auf Plasma-Lipoproteine bzw. auf das darin enthaltene Cholesterin; andererseits haben sie auf Makrophagen einen negativen Einfluss, indem sie diese zu Suppressor-Monozyten umprogrammieren und indem sie die beschleunigte Aufnahme von Plasmalipiden (Cholesterin) via den IC-Lipoprotein-Komplex fördern[24].

Trotz ausgeweiteter Forschungstätigkeit und den damit verbundenen Erfolgen besteht für die in der westlichen Welt immer noch häufigste Todesursache[46] großer Erklärungsbedarf, da die bisher bekannten Risikofaktoren erst ca. die Hälfte der auftretenden Fälle erklären können.

## **2 Zielsetzung**

Die pathologischen Mechanismen, welche zur Manifestation Immunkomplex assoziierter degenerativer Krankheiten führen, laufen im menschlichen Organismus über Jahre und Jahrzehnte hinweg ab.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist zum Einen die Entwicklung eines in-vitro Systems, das die Möglichkeit bietet, die Bildung von Immunkomplex-Lipoprotein Aggregaten durch Zugabe von Polypeptiden zu beschleunigen, sowie steuerbar und vorhersehbar zu machen. Diese Systeme zur Präzipitation von Immunkomplex-Lipoprotein Aggregaten ermöglichen in-vitro die Erforschung von potentiellen therapeutischen Wirkstoffen. Im zweiten Teil dieser Arbeit steht die Identifikation von Wirkstoffen im Vordergrund, die bereits gebildete und präzipitierte Aggregate in-vitro wieder aufzulösen vermögen. So soll die Anwendbarkeit des Präzipitationssystems getestet werden.

Es ist von höchstem medizinischem Interesse, biochemische Wirkstoffe zu identifizieren, die in der Lage sind, dem Blutplasma eine gesteigerte Cholesteroltransportkapazität zu verleihen oder gebildete Präzipitate wieder aufzulösen, da derartige Präzipitate in-vivo in der Lage sind, das Immunsystem zu aktivieren und eine Reaktionskaskade auszulösen. Mögliche Konsequenzen solcher Kaskaden für die Pathogenese und den Verlauf immunkomplex-assoziiierter Erkrankungen wurden bereits im theoretischen Teil (Kapitel 1) beschrieben.

Zur Erforschung dieser Wirkstoffe müssen zuerst Versuchsbedingungen geschaffen werden, um die Komplexbildung zu simulieren und zu beschleunigen. Solche Versuchsbedingungen wurden in dieser Dissertation im ersten Teil untersucht.

Vor, während oder nach Ablauf der kontrolliert getriggerten Reaktion ist es dadurch möglich, geeignete Substanzen in-vitro zu testen, die das Fortschreiten der Pathogenese bremsen oder verhindern. Dies könnte der erste Schritt bezüglich medizinisch anwendbarer Therapeutika darstellen, die dann in verschiedensten anderen Systemen sowohl in-vitro als auch in-vivo auf ihre pharmakodynamischen und kinetischen Wirkungsweisen getestet werden müssten.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 ELISA-Photometer**

Die Extinktionsmessungen von Serumcholesterin wurden mit einem automatisierten Lochplattenspektralphotometer (Firma Molecular Device, Typ Thermo Max, California) durchgeführt.

#### **3.2 Waage**

Zur Einstellung von Lösungen definierter Konzentration wurde eine Präzisionswaage (Firma Mettman, Typ AT 250, Schweiz) verwendet.

#### **3.3 pH-Meter**

Mit Hilfe eines Präzision-pH-Meters (Firma Metrohm, Typ E510, Herisau-Schweiz) wurden ausgewählte Ansätze auf einen gewünschten pH-Wert eingestellt.

#### **3.4 Geräte**

Sonstige Geräte, die zur Durchführung der Versuche notwendig waren, gehören zur Standardausrüstung eines biochemischen Labors.

#### **3.5 Versuchssubstanzen und Chemikalien**

##### **3.5.1 Normales Humanserum (NHS)**

Um sich physiologischen Bedingungen zu nähern, wurde Normales Humanserum (Firma Sigma Diagnostics, Best.-Nr. 2257) verwendet, da das darin enthaltene Cholesterin durch die enthaltenen Lipoproteine nicht aggregiert war und somit in einer heterogenen Lösung vorlag.

##### **3.5.2 Immunkomplexe**

Die verwendeten Immunkomplexe wurden aus menschlichem Immunglobulin G (Human-IgG, Sigma, Produkt Nr.I-4506) und aus spezifischen Antikörpern (Anti-Human-IgG, Sigma, Produkt Nr.I-9384) hergestellt. Gleiche Mengen beider Lyophilisate wurden zusammen in aqua <sub>dest.</sub> rekonstituiert, die Lösung hatte eine Konzentration von 2mg/dl Antigen-Antikörper-Substrat.

Der Nachweis der Bildung von Immunkomplexen bei einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde in unserem Arbeitskreis bereits durch das Testverfahren ImmuSTRIP (Firma.Medac GmbH, Produkt-Nr.1008) erbracht.

### 3.5.3 Modulierende Substanzen

Um die miteinander reagierenden Stoffe unterschiedlichen Milieubedingungen auszusetzen und ihre molekularen Eigenschaften im Hinblick auf ihr Interaktionsvermögen zu verändern, wurden verschiedene Chemikalien verwendet, deren Auswirkungen unter **Punkt 4.8.2** erläutert werden. Es kamen 0,1 molare Salzsäure, Polyethylenglykol (Firma. Sigma Chemicals, PEG 10) mit einer Molekularmasse von 10.000 Dalton, Polyvinylpyrolidon (Firma.Sigma Chemicals, PVP 40) mit einer Molekularmasse von 40.000 Dalton zum Einsatz. Ein weiterer Bestandteil der meisten Versuchsansätze waren  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Calciumchloridhydrat (Firma Merck, Art.-Nr.2382) und Magnesiumchloridhydrat (Firma Merck, Art.Nr. 5833) wurden mit 0,9% NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 40 mmol/l ( $\text{CaCl}_2$ ), bzw. 13 mmol/l ( $\text{MgCl}_2$ ) eingestellt und den Testansätzen zugefügt.

### 3.5.4 Polymere und Heteropolymere

Um den Einfluss in-vivo vorkommender Sezernierungsproteine (z.B. von hyperaktivierten Makrophagen) in Bezug auf ihre physikalisch-chemischen Wechselwirkungen in-vitro sichtbar und nachvollziehbar zu machen, kamen in ihren molekularen Eigenschaften bekannte artifizielle und z.T. nicht-physiologische Polypeptide zum Einsatz. So konnten Aussagen über die intermolekularen Wechselwirkungen gemacht werden und die Ergebnisse miteinander verglichen werden. Die nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Polymere auf:

Polypeptid	Molekulargewicht (Dalton)	Isoelektrischer Punkt (pH)	Eigenschaften	Sigma-Produkt-Nummer
Poly-D,L-Alanin	1000-5000	6,00	hydrophob, unpolar	P 9003
Poly-L-Arginin	70000-100000	11,15	hydrophil,basisch	P 3892
Poly-Arginin-Tyrosin 4:1	-	11,15 5,66	-	P 7411
Poly-L-Asparagin	5000-15000	2,77	ungeladen, polar	P 8137
Poly-D,L-Aspartat	2000-10000	2,77	negativ geladen, sauer	P 3418
Poly-L-Glutamin	40000-60000	5,65	ungeladen, polar	P 1899
Poly-L-Glutaminsäure	600 2000-15000 50000-100000	-	sauer, negativ geladen	P 1943 P 4636 P 4886
Poly-Glutamin-Leucin 4:1	30000-70000	5,65 5,98	hydrophob, ungeladen unpolar	P 0812

Poly-Glutamin-Tyrosin 4:1	20000-50000	5,65 5,66	ungeladen, polar	P 0275
Poly-Glutamin-Lysin-Tyrosin 6:3:1	-	-	-	P 4409
Poly-L-Glycin	2000-5000	5,97	hydrophob, unpolar	P 8791
Poly L-Histidin	15 000-30 000	7,74	basisch, polar	P 2534
Poly-L-Lysin	1000-4000 15 000-30 000 70 000 150000-300000	9,59	hydrophil, positiv geladen, basisch	P 0879 P 7890 P 1399 P 4158
Poly-L-Lysin succinyliert	15000-30000	9,59	hydrophil,basisch,positiv geladen	P 4238
Poly-Lysin-Alanin 1:1/ 3:1	5000-15000	9,59 6,00	hydrophob	P 4024 P 1151 P 5209
Poly-Lysin-Tyrosin1:1 /4:1	50000-150000	9,59 5,66	ungeladen, polar	P4274/ P 4659
Poly-L-Ornithin	5000-15000	-	-	P 4538
Poly-Ornithin-Tyrosin 4:1	-	-	-	P 4534
Poly-L-Prolin	5000-20000	-	-	P 0388
Poly-L-Tyrosin	10 000 und 40 000	5,66	hydrophob, ungeladen,	P 1800
Poly-L-Tryptophan	1000-5000	5,89	hydrophob, aromatisch, unpolar	P 4647

**Tabelle 1:** verwendete Polymere und Heteropolymere (-: keine Angaben des Herstellers)

### 3.6 Nachweismethoden

#### 3.6.1 Monotest Cholesterin

Zur Bestimmung der Serumcholesterolkonzentration in den Versuchsansätzen wird der Monotest Cholesterin (Firma Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 237574) verwendet, der auf einer enzymatischen Färbung nach der Chod-PAP-Methode beruht. Das Testreagenz wird in 100 ml aqua<sub>dest</sub> gelöst und für 10 Minuten inkubiert. Im Kühlschrank hat das Reagenz eine Haltbarkeit von 4 Wochen.

2,0ml der Reagenzlösung werden in eine Plastikkuvette (Firma Eppendorf) mit 1cm Schichtdicke pipettiert und mittels eines Photometers zum Nullabgleich gebracht.

Ein Versuchsansatz besteht aus 2ml Stammlösung und 20 $\mu$ l zu pipettierendem Probenmaterial. Die Lösung wird für 10min inkubiert und anschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 510nm bestimmt.

Zur Berechnung der Cholesterinkonzentration dient die Näherungsformel der Firma Boehringer:

$$c \text{ (mg/dl)} = 575 \times \text{Extinktion der Probe}$$

### 3.6.2 Modifikation der Standardmessmethode

Aufgrund des großen Probenumfangs dieser Arbeit musste das Einzelmessverfahren früherer Arbeiten (Arvantini A., Klæßen D.) stark modifiziert werden. Ziel war es, die Messungen mit einem großen Probensatz zu automatisieren. Zu diesem Zweck kam ein ELISA-Photometer zum Einsatz, dessen Konstruktion es erlaubt, 96 Proben gleichzeitig in die Vertiefungen einer Trägerplatte aus durchsichtigem Kunststoff einzubringen und innerhalb von 15 Sekunden deren Extinktion zu bestimmen.

Bei der Etablierung dieser Methode sollte einerseits die Korrelation mit früheren Daten gewährleistet bleiben. Andererseits musste eine hohe Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig geringen Kosten erreicht werden.

Um eine Korrelation mit früheren Daten zu erreichen, mussten die Parameter Anregungswellenlänge sowie Probenmenge/Reagenzmenge durch Vorversuche überprüft und entsprechend moduliert werden. Die Messbehältnisse haben ein Fassungsvermögen von 310 $\mu$ l, die Trägerplatte ist, um Verwechslungen vorzubeugen, mit einem Koordinatensystem beschriftet. Die X-Achse trägt Zahlenwerte von 1-12, die Y-Achse Buchstaben von A-H. Das Messgerät ist an einen Apple-Computer (Typ PowerMac 7300/200) angeschlossen, auf dem das zugehörige Steuerungs- und Auswertungsprogramm Soft Max Pro (Firma. Molecular Device, California) die Ergebnisse sichtbar macht. Um zuverlässig verwertbare Ergebnisse zu erhalten, wurde jedem Probenansatz bei jeder Messung 3 Fraktionen aus dem Überstand entnommen und nebeneinander auf die Trägerplatte pipettiert. Es bestand die Möglichkeit, das Auswertungsprogramm auf die Koordinaten der jeweils zugehörigen Messbehälter einzustellen, so dass der Mittelwert der Proben ebenfalls automatisch errechnet wurde.

Die Extinktionen wurde mittels monochromatischem Licht der Wellenlänge 490nm ermittelt. Diese Verschiebung der Anregungswellenlänge ist durch das ELISA-Messgerät vorgegeben. Auf die Empfindlichkeit der Chod-PAP-Methode hat diese Verschiebung keinen Einfluss.

Die Probenmenge wurde sukzessive durch Verdünnungsreihen von 20µl auf 5µl, die zuge-setzte Reagenzmenge von 2ml auf 300µl, reduziert.

Die Reproduzierbarkeit wurde anhand eines Minimaltests (Präzisionskontrolle) überprüft. Hierbei werden genau definierte Cholesterinkonzentrationen (Konzentrationsintervall: 50mg/dl bis 400 mg/dl (Preciset, Firma Boehringer, Best-Nr. 125512)) vorgegeben und die formal berechnete Extinktion mit im Versuch bestimmten Extinktionswerten verglichen (**Abb.1**). Die Ergebnisse zeigen einen R-Wert von 0,92.

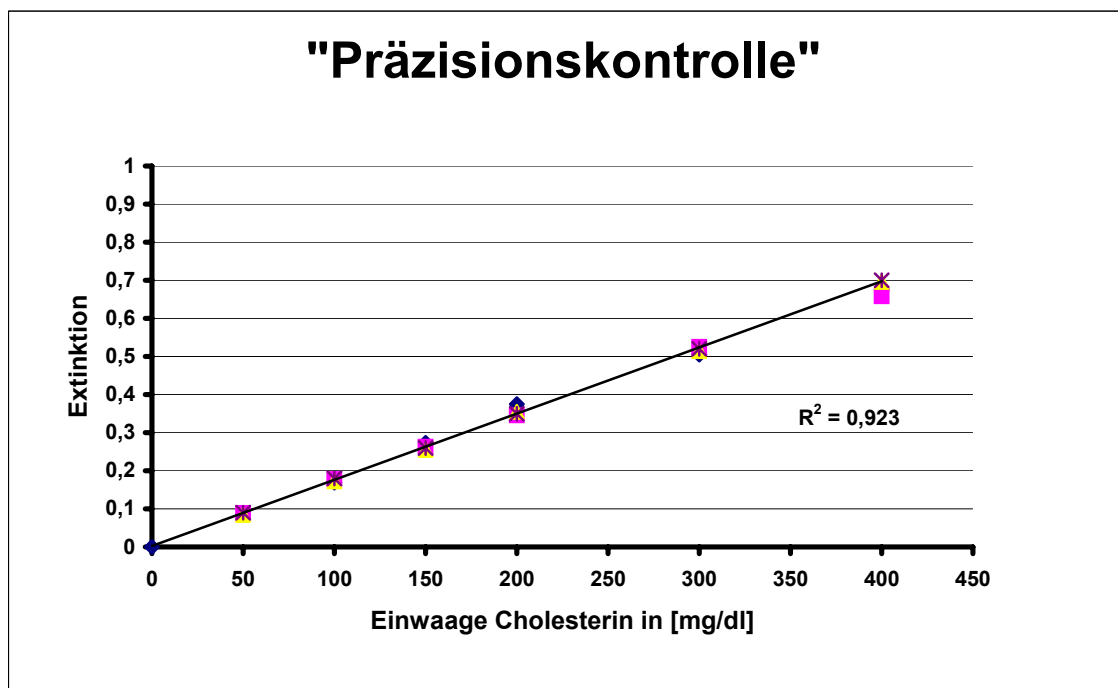


Abbildung 1: graphische Darstellung der Chod-PAP-Präzisionskontrolle

### 3.7 Versuchsdesign

#### 3.7.1 Fragestellung und methodische Rahmenbedingungen

Die grundlegende Fragestellung dieser Arbeit ist, inwieweit unspezifische Immunkomplexe unter definierten Bedingungen aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften hydrophobe bzw. polare Wechselwirkungen zu cholesterolhaltigen Lipoproteinvesikeln entfalten, die eine Ausbildung von IC-Lipoprotein-Komplexen begünstigen und welchen Einfluss artifi-zielle Modellpeptide darauf haben. Da in der Fachliteratur keine spezifische Nachweismetho-de bezüglich dieser Aggregate vorliegt, musste auf ein indirektes Bestimmungsverfahren zu-rückgegriffen werden. Experimentell zugänglich ist eine photometrische Konzentrationsbe-stimmung von Cholesterol (Extinktionsmessung).



Diese Konzentrationsbestimmung ermöglicht im Experiment-durch Abnahme der Cholesterolkonzentration-Rückschlüsse, inwieweit eine Aggregation stattgefunden bzw. mit welcher Geschwindigkeit die IC-Lipoprotein-Komplexe aggregieren.

### 3.7.2 Versuchsplanung

Die in-vitro Versuche sind so konzipiert, dass jeweils zwei identische Ansätze hergestellt werden, die sich durch das Fehlen (-IC) bzw. das Vorhandensein (+IC) von Immunkomplexen unterscheiden. Es erfolgt die photometrische Bestimmung des Cholesterols im Ansatzüberstand sofort nach Herstellung und nach Zeitabständen von zwei, fünf und zehn Tagen bei Zimmertemperatur. Kommt es im +IC-Ansatz zu einer stärkeren Abnahme der Extinktion im Überstand als im -IC-Ansatz, so kann mit großer Sicherheit darauf geschlossen werden, dass die Immunkomplexe als einzige Variable dafür verantwortlich sind.

Um die miteinander interagierenden Komponenten zusätzlichen Einflüssen auszusetzen, wurden die Testansätze mit Substanzen versehen, deren Funktion unter **Tab. 2** erläutert wird. Durch den Einsatz von synthetischen Polypeptiden, deren Struktur und Moleküleigenschaften genau bekannt sind, soll der Einfluss in-vivo vorkommender Proteine, die z.B. im Rahmen einer persistierenden Makrophagenaktivierung gebildet werden, simuliert werden. **Tab. 1** listet die eingesetzten Polymere auf, **Tab. 3** die Inhaltsstoffe der Versuchsansätze:

Zugesetzte Substanz	Zielsetzung
0,1 molare Salzsäure (HCl)	-Absenkung des pH-Wertes (vgl. Einleitung)
Polyvinylpyrolidon (PVP) 1%	-Schwächung der die Moleküle umgebenden Hydrathülle zur Beschleunigung der Aggregationsgeschwindigkeit
Trichloressigsäure (TCA) 1%	-Verstärkung der negativen Gesamtladung von Immunkomplexen zur Anregung der intermolekularen Anziehungskräfte
Glutaraldehyd 1%	
CaCl <sub>2</sub> , 40mmol	-Ausbildung intermolekularer Brücken zur Verstärkung der Anziehungskräfte
MgCl <sub>2</sub> , 40mmol	

**Tabelle 2:** Art und Konzentration der modulierend einwirkenden Zugaben

Unveränderte Bestandteile	Variierende Bestandteile
Grund- und Füllmittel: NaCl 0,9%	HCL.: 0,1mol/l
Normales Humanserum: 1:2 verdünnt	PVP 40: 1%
MgCl <sub>2</sub> : 13 mmol/l	PEG 10: 1%
CaCl <sub>2</sub> : 40 mmol/l	TCA: 1%
Polypeptid: 1mg/ml	Glutaraldehyd: 1%

**Tabelle 3:** Inhaltsstoffe der Versuchsansätze und deren Konzentrationen

Die ausgewählten Polypeptide werden drei verschiedenen Versuchsstrategien unterworfen.

### Versuchstyp 1

Dieser Versuchstyp ist in drei Abschnitte geteilt, wobei

Abschnitt I aus den Ansätzen Nr. 1-3 besteht und neben dem Polypeptid keine Immunkomplexe beinhaltet.

In Abschnitt II (Nr. 4-6) erfolgt die Immunkomplexzugabe vor der eigentlichen Testsubstanz nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur.

In Abschnitt III (Nr.7-9) aggregiert zuerst das Polypeptid mit dem Grundansatz, bevor nach 10 min die Immunkomplexe beigefügt werden.

Alle Ansätze werden in Microtubes pipettiert und haben ein Endvolumen von 910 µl.

Die Messungen erfolgten am ersten Tag nach einer Inkubationsdauer von 30 min

(1. Messwert), am darauffolgenden Tag (2. Messwert), am fünften (3. Messwert) und zehnten Tag (4. Messwert).

Jedem Versuchsbehälter wurden drei Proben eines Volumens von 3 µl aus dem Überstand entnommen und der Extinktionswert bestimmt. Einen Überblick zeigt das Pipettierschema in

**Tab. 4 :**

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>NHS 2:1</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>HCl 0,1mol</b>	-	10	20	-	10	20	-	10	20
<b>CaCl<sub>2</sub> 40mmol/l</b>	40	40	40	40	40	40	40	40	40
<b>MgCl<sub>2</sub> 13mmol/l</b>	40	40	40	40	40	40	40	40	40
<b>NaCl 0,9%</b>	630	620	610	330	320	310	330	320	310
<b>Polypeptid/IC</b>	100	100	100	IC300	IC300	IC300	PP100	PP100	PP100
<b>Inkubationszeit</b>				10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min
<b>IC/Polypeptid</b>	-	-	-	PP100	PP100	PP100	IC300	IC300	IC300

**Tabelle 4:** gemeinsames Pipettierschema zum Versuchstyp 1 ( IC=Immunkomplex, PP=Polypeptid)

### Versuchstyp 2:

Dieser Versuchstyp besteht aus zwei Teilen, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit von Immunkomplexen unterscheiden. Neben unterschiedlichen pH-Werten (pH 7: Ansatz Nr. 1-4 und Nr. 9-12 / pH 5: Ansatz Nr. 5-8 und Nr.13-16) werden, wie aus den Schemata (**Tab 3**) ersichtlich, Zusatzsubstanzen beigefügt, deren Auswirkungen in Tab. 1 erläutert wurden. Die pH-Werte wurden mit Hilfe eines pH-Meters eingestellt wobei der zeitliche Ablauf der Datenerhebung gemäß der Vorgehensweise bei Versuchstyp 1 erfolgte.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl 0,9%	630	530	530	530	620	520	520	520
NHS 2:1	100	100	100	100	100	100	100	100
TCA 1%	-	100	-	-	-	100	-	-
GA 1%	-	-	100	-	-	-	100	-
PVP 1%	-	-	-	100	-	-	-	100
HCl 0,1mol	-	-	-	-	10	10	10	10
CaCl <sub>2</sub> 40mmol/l	40	40	40	40	40	40	40	40
MgCl <sub>2</sub> 13mmol/l	40	40	40	40	40	40	40	40
Polypeptid	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 5: Pipettierschema A zu Versuchstyp 2 ohne Zusatz von Immunkomplexen

Ansatz-Nr.	9	10	11	12	13	14	15	16
NaCl 0,9%	330	230	230	230	320	220	220	220
NHS 2:1	100	100	100	100	100	100	100	100
TCA 1%	-	100	-	-	-	100	-	-
GA 1%	-	-	100	-	-	-	100	-
PVP 1%	-	-	-	100	-	-	-	100
HCl 0,1mol	-	-	-	-	20	20	20	20
CaCl <sub>2</sub> 40mmol	40	40	40	40	40	40	40	40
MgCl <sub>2</sub> 13 mmol	40	40	40	40	40	40	40	40
Polypeptid 1mg/l	100	100	100	100	100	100	100	100
IC	300	300	300	300	300	300	300	300

Tabelle 6: Pipettierschema B zu Versuchstyp 2 mit Zusatz von Immunkomplexen

### Versuchstyp 3:

Versuchstyp 3 baut auf Messergebnisse, die bei Versuchstyp 1 und 2 dieser Arbeit ermittelt wurden, auf.

Die Auswirkungen der Polypeptide auf ein Versuchssystem lassen sich in „Trends“ zusammenfassen, so dass Gruppen entstehen, die sich vornehmlich durch ihre Präzipitationsgeschwindigkeit voneinander unterscheiden. Es konnten langsame, mittlere und schnelle „Präzipitatorsubstanzen“ erkannt und ihren Gruppen zugeordnet werden.

Aus jeder Gruppe wurde ein Vertreter, dessen Trendkurve besonders deutlich ausgeprägt war, ausgewählt und erneut einem Ansatz **Typ 1** unterworfen. Erwartungsgemäß liefen die Aggregationsvorgänge unterschiedlich schnell ab, so dass die Aktivitäten im System mit der schnellen Gruppe nach einem, in der mittleren nach fünf und in der langsamen Gruppe nach zehn Tagen zum Erliegen kamen.

Zu diesen Zeitpunkten wurden erneut ausgewählte Polypeptide zugefügt, um diesmal ihre Einflussmöglichkeiten auf bereits bestehende Immunkomplex-Lipoprotein-Konglomerate zu überprüfen. Die Konzentrationen entsprechen dabei ebenfalls **Versuchstyp 1**.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
NaCl	610	610	610	610	310	310	310	310
CaCl <sub>2</sub>	40	40	40	40	40	40	40	40
MgCl <sub>2</sub>	40	40	40	40	40	40	40	40
HCl	20	20	20	20	20	20	20	20
NHS	100	100	100	100	100	100	100	100
IC					300	300	300	300
Präzsubst	100	100	100	100	100	100	100	100
Pause	Schnelle Präz.: 1Tag/ mittlere Präz.: 5Tage/ langsame Präz.: 10Tage							
Testsubst.	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 7: Pipettierschema zu Versuchstyp 3

### 3.7.3 Versuchsauswertung

Da die gemessenen Extinktionen von der optischen Dichte der verwendeten Substanzen abhängig waren, wurde im Vorfeld jeder Testreihe die Eigenextinktion der Substanzen bestimmt, um sie gegebenenfalls mit zu berücksichtigen.

Dem Überstand jedes Ansatzes wurden drei Probefraktionen à 5µl entnommen und die Extinktionsbestimmung durchgeführt. Die resultierenden Mittelwerte konnten daraufhin miteinander verglichen und interpretiert werden.

Aufgrund der geringen Anzahl an identischen Ansatzwiederholungen (Minimalbestimmung) war eine statistische Auswertung der Ergebnisse nicht möglich.

## 4 Ergebnisse

An dieser Stelle soll noch einmal erwähnt werden, dass im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Reihe von Vorversuchen nötig waren, um die Messmethode auf ein automatisiertes Verfahren umzuarbeiten. Die Vorteile der neuen Messmethode mittels ELISA-Photometer stellen sich im Vergleich zur herkömmlichen Einfach-Küvettenmessung folgendermaßen dar:

1. es wird eine deutliche Beschleunigung der Versuchsauswertung erreicht, da 96 Werte in 15 Sekunden gewonnen werden und diese anschließend sofort in einer mit dem Gerät kompatiblen Software weiterverarbeitet werden können;
2. enorme Kostenersparnis durch geringeren Bedarf an Nachweisreagenz (2ml→300µl);
3. größere Genauigkeit der Messergebnisse, da weniger Substrat aus den Überständen entnommen wird (20µl→5µl) und die dort herrschenden Verhältnisse so möglichst gering verändert werden.

Da unsere Versuche hauptsächlich eine Änderung des Cholesterolgehaltes im Überstand der Messbehälter nachzuweisen versuchen, ist es vorteilhaft, möglichst geringe Mengen daraus zu entnehmen. So ist es möglich, den Verlauf der Veränderungen mit größerer Präzision zu bestimmen.

Nachfolgend sind die Messwerte von 48 ausgewählten Versuchen, die den allgemeinen Trend widerspiegeln, in tabellarischer und graphischer Form dargestellt.

### 4.1 Einfluss von Immunkomplexen (IC) auf die Serumstabilität in Anwesenheit des kationischen, positiv geladenen Polypeptids Lysin in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Reihenfolge der IC-Zugabe

Die folgenden Versuche Nr. 1-8 sind der Kategorie Versuchstyp 1 zugeordnet. Die entsprechenden Pipettierschemata und Konzentrationen der verwendeten Stoffe finden sich aufgrund besserer Übersichtlichkeit in Abschnitt Material und Methoden, Kapitel 3.8.1.

Lysin ist eine  $\alpha,\epsilon$ -Diaminocapronsäure, eine in fast allen Proteinen enthaltene Aminosäure, die wegen ihrer Seitenkette zu den basischen AS gerechnet wird. Die verwendeten Polymere unterscheiden sich zunächst in ihrem Molekulargewicht und ihrer Konfiguration (D-/L-Konfiguration), in den Versuchen 4-8 kommen Heteropolymere zum Einsatz, die zu einem Teil immer aus Lysin bestehen. So können die Ergebnisse besser miteinander verglichen und Rückschlüsse auf den Einfluss der getesteten Substanzen gezogen werden.

**4.1.1 Versuch 1: Das positiv geladene, basisch, hydrophile Polypeptid Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 15 000 und 30 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 7890)**

Lysin ist eine an der Bildung fast aller Proteine beteiligte Aminosäure. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 9,59.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,127	0,131	0,131	0,128	0,132	0,135	0,128	0,132	0,134
2. Tag	0,034	0,150	0,143	0,012	0,139	0,150	0,013	0,141	0,155
5. Tag	0,060	0,112	0,124	0,028	0,089	0,140	0,033	0,087	0,137
10. Tag	0,074	0,101	0,090	0,081	0,073	0,116	0,076	0,072	0,146

Tabelle 8: Messergebnisse von Poly-L-Lysin bei Variation der Immunkomplexzugabe

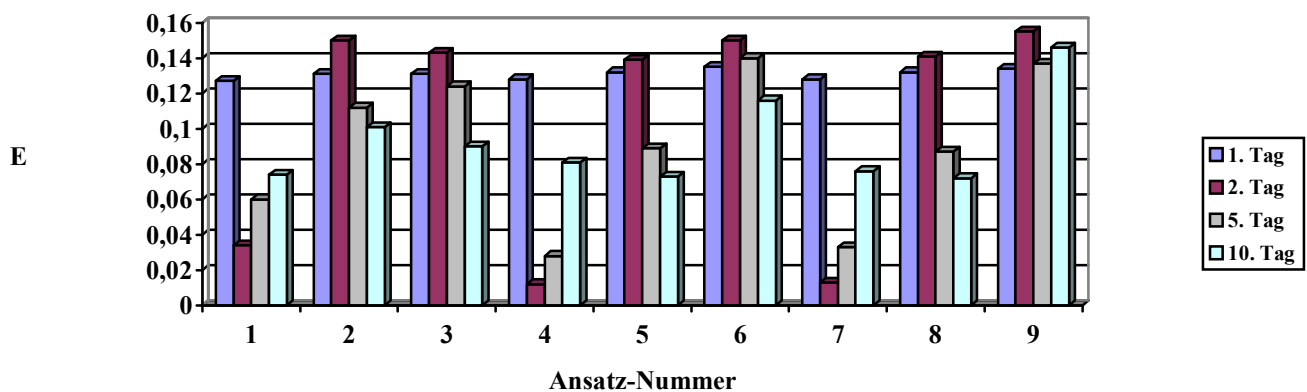


Abbildung 2: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000

Nach 48 Stunden kommt es in Ansatz Nr.1 zu einem ausgeprägten Abfall auf 27% der Ausgangsextinktion. Betrachtet man die Ansätze Nr. 4 und 7, deren pH-Wert sich ebenfalls im physiologischen Bereich bewegt, so ist zunächst eine deutliche Verstärkung der Präzipitationstendenz festzustellen ( Abfall auf 10% in Nr.4 auf 11% in Nr.7). In allen drei Behältern kommt es jedoch am fünften und zehnten Tag zu einem Wiederanstieg des Messwertes, was als eine Art „Aufschwimmeffekt“ von cholesterolhaltigen Lipoproteinen bezeichnet werden kann.

Steigt der  $H_3O^+$ -Gehalt des Modellsystems, so ist eine deutliche Abschwächung der intermolekularen Anziehungskräfte zu registrieren. Die Aggregationsneigung der im Versuch zusammgeführten Moleküle nimmt ab, wobei das Vorhandensein von Immunkomplexen nicht zu einer eindeutigen Verstärkung der Präzipitatbildung führt.

#### 4.1.2 Versuch 2: Poly-DL-Lysin mit einem Molekulargewicht >70 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4158)

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,187	0,204	0,168	0,187	0,188	0,181	0,195	0,181	0,165
2. Tag	0,065	0,166	0,159	0,057	0,131	0,173	0,055	0,099	0,160
5. Tag	0,049	0,139	0,154	0,029	0,090	0,168	0,031	0,066	0,154
10. Tag	0,033	0,134	0,143	0,019	0,094	0,166	0,018	0,074	0,151

Tabelle 9: Messergebnisse von Poly-DL-Lysin bei Variation der Immunkomplexzugabe

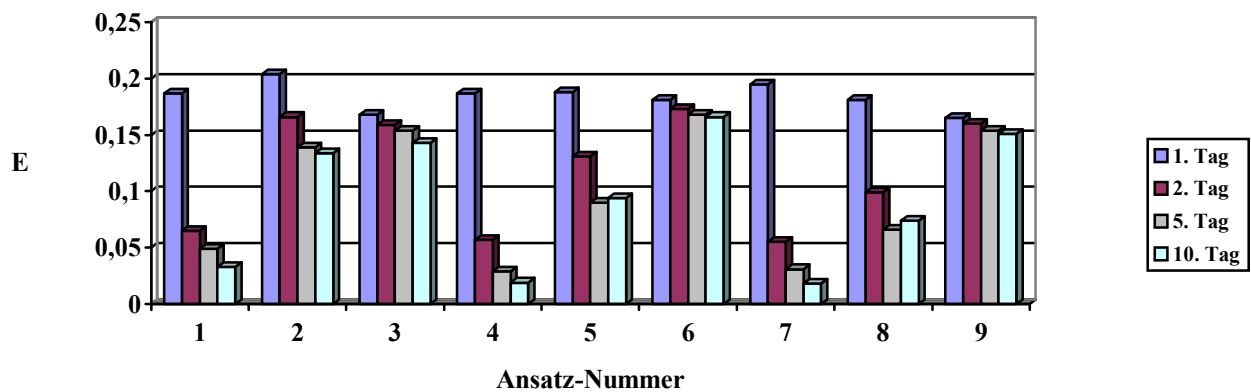


Abbildung 3: Extinktionsverlauf von Poly-DL-Lysin

Die hier untersuchte DL-Konfiguration des Testpolymeres Lysin macht durch eine verstärkte Beeinflussung der Systemstabilität bei pH 7 (Ansatz Nr.1 fällt auf 18%), abhängig von Immunkomplexzugaben (Ansätze Nr.4 und 7 fallen auf 11 bzw.10%), noch einmal deutlich, wie entscheidend die Plasmakonstitution von Ladungsverteilungen innerhalb eines extern zugeführten Moleküls abhängig ist. Im Gegensatz zu den L-Konfigurationen liegen die interagierenden Molekülpartitionen auch in angesäuertem Milieu derart zueinander, dass ausreichend stattfindende Interaktionen einen Cholesterinabfall verursachen können.

Auch im sauren Milieu bei pH 5 kommt es zu einer Senkung der Cholesterinfraktion, die diesmal durch die frühere Zugabe der Testsubstanz vor den Immunkomplexen forciert wird (Ansatz Nr.8: Testsubstanz vor Immunkomplexzugabe bewirkt einen Abfall auf 39% des Ausgangswertes, im Vergleich dazu Ansatz Nr. 5 mit einem Absinken auf 48% am dritten Tag der Messreihe.)

### 4.1.3 Versuch 3: Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 150 000 und 300 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1399)

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,179	0,195	0,169	0,166	0,183	0,177	0,185	0,185	0,168
2. Tag	0,036	0,180	0,166	0,040	0,101	0,175	0,045	0,133	0,164
5. Tag	0,020	0,160	0,165	0,022	0,051	0,181	0,025	0,073	0,158
10. Tag	0,030	0,147	0,155	0,011	0,062	0,179	0,015	0,081	0,156

Tabelle 10: Messergebnisse von Poly-L-Lysin bei Variation der Immunkomplexzugabe

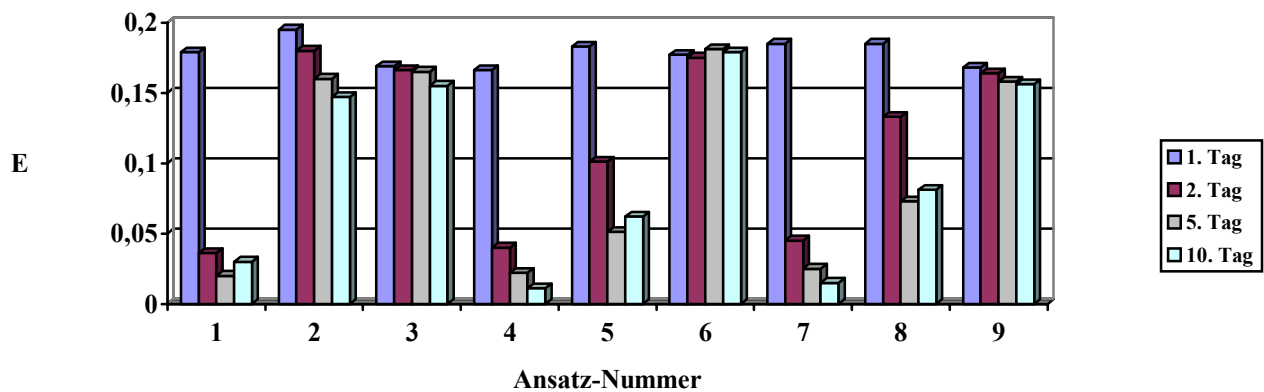


Abbildung 4: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 150 000-300 000

Die zehnfache Erhöhung der Molekülgröße bewirkt eine Verstärkung der in Versuch 1 beobachteten Reaktion (Abfall der Cholesterinfraktion im Überstand auf 12% des Ausgangswertes bereits am zweiten Tag der Messung), wobei das Polypeptid bei pH 7 gleichermaßen stark präzipitierende Wirkung zeigt.

Vorhandene Immunkomplexe können das Phänomen zusätzlich noch leicht verstärken, am jeweils 10.Tag bewirken sie ein endgültiges Absinken des Cholesterolgehaltes im Überstand auf 7% (Ansatz Nr.4) bzw. 9% (Ansatz Nr.7).

Zusätzlich kommt es auch im Bereich von pH 5 zu Präzipitation. Ohne Anwesenheit von Immunkomplexen herrschen stabile und energetisch ausgeglichene Molekülverhältnisse. Die Zugabe der IC bewirkt einen deutlichen Abfall auf 28% am dritten Tag (vgl.Versuch Nr.5) nach ihrer Zugabe vor der Testsubstanz und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Versuch Nr.8 zeigt weniger ausgeprägte Extinktionsabnahmen, so dass der Einfluss der Zugabereihenfolge ist hier deutlich zu erkennen ist.



#### 4.1.4 Versuch 4: Das Heteropolymer Poly-Lysin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 1:1 und einem Molekulargewicht zwischen 50 000 und 150 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4274)

In dieser Anordnung, die ebenfalls dem Versuchstyp 1 entspricht, wird das positiv geladene und das die hydrophobe Aminosäure enthaltene Heteropolymer Poly-L-Lysin-L-Tyrosin als Reaktionspartner verwendet. Die Moleküle liegen in einem Verhältnis von 1:1 vor.

Tyrosin gehört zu den aromatischen hydrophoben Aminosäuren mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 5,66.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	PH 5	pH 3
1. Tag	0,205	0,206	0,141	0,210	0,220	0,134	0,201	0,201	0,131
2. Tag	0,028	0,009	0,143	0,024	0,005	0,131	0,032	0,005	0,130
5. Tag	0,016	0,006	0,148	0,016	0,004	0,131	0,019	0,004	0,130
10. Tag	0,011	0,003	0,139	0,015	0,002	0,129	0,013	0,002	0,130

Tabelle 11: Messergebnisse von Poly-Lysin-Tyrosin 1:1 bei Variation der Immunkomplexzugabe

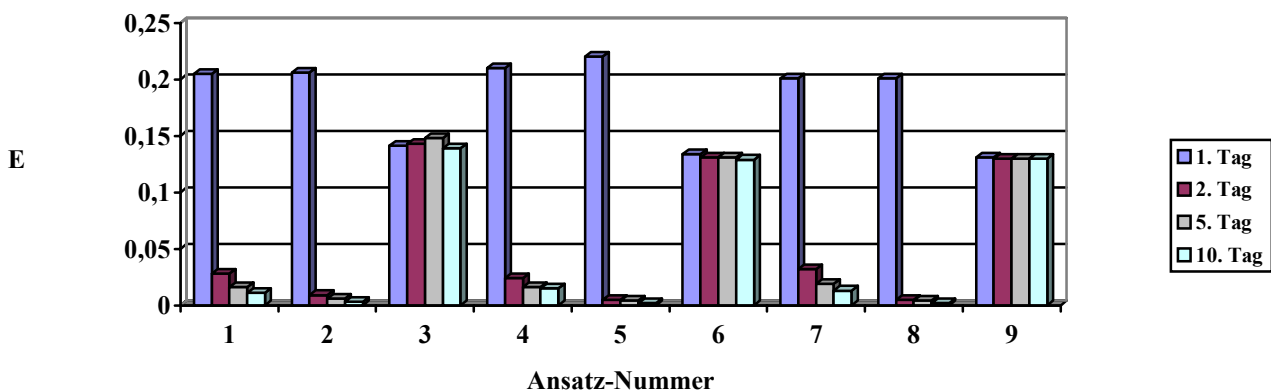


Abbildung 5: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin Tyrosin 1:1

Die optimalsten Voraussetzungen bieten sich bei pH 5, es erfolgt ein Absinken der Ausgangsextinktion auf 2% in Ansatz-Nr.2, Immunkomplexe verstärken den Effekt um einen weiteren Prozentpunkt (Ansätze Nr.5 und 8).

Das Heteropolymer verursacht bei physiologischem pH eine ausgeprägte Präzipitation der Lipoproteinvesikel nach 48 Stunden auf 5% (Nr.1), der Zusatz von Immunkomplexen verstärkt die Fällungserscheinungen noch um einige Prozentpunkte. Die Reihenfolge der IC-Zugabe hat dabei keinen Einfluss auf die Größe der Extinktionsabnahme.

#### 4.1.5 Versuch 5: Das Heteropolymer Poly-Lysin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4659)

Im Unterschied zu Versuch Nr.4 wird hier ein Heteropolymer mit denselben Reaktionspartnern untersucht, sie sind jedoch in einem Verhältnis von 4:1 zu einem Molekül synthetisiert.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,117	0,123	0,116	0,121	0,120	0,117	0,122	0,122	0,097
2. Tag	0,057	0,054	0,115	0,042	0,041	0,117	0,036	0,038	0,097
5. Tag	0,063	0,057	0,106	0,044	0,040	0,110	0,039	0,042	0,092
10. Tag	0,073	0,072	0,084	0,059	0,080	0,108	0,066	0,066	0,072

Tabelle 12: Messergebnisse von Poly-Lysin-Tyrosin 4:1 bei Variation der Immunkomplexzugabe

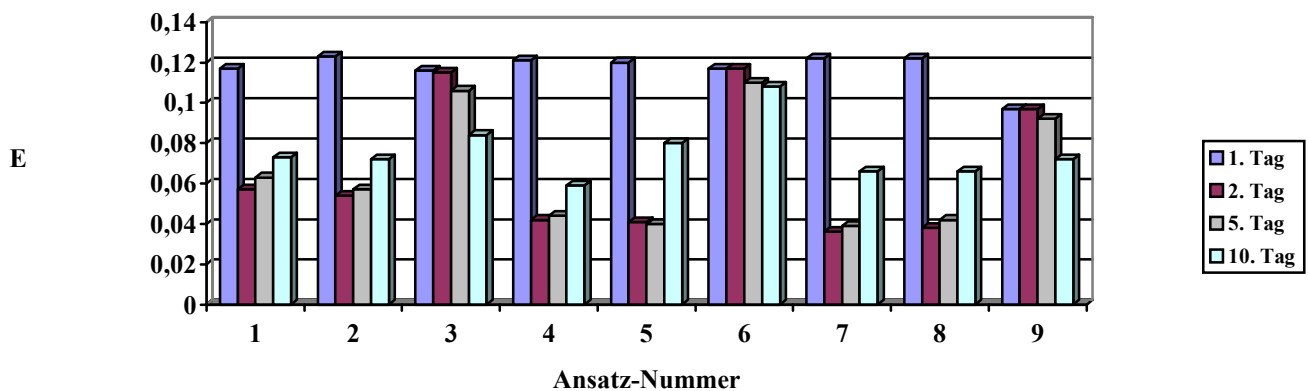


Abbildung 6: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Tyrosin

Die Reaktionsergebnisse fallen deutlich abgeschwächer als im Vorversuch aus, jedoch bewirken auch hier zugesetzte Immunkomplexe eine verstärkte Abnahme der Ausgangsextinktion. Bei pH 5 sind den bei physiologischem pH auftretenden Ergebnisse vergleichbare Werte zu registrieren, wobei die Reihenfolge der Immunkomplexzugabe keinen Einfluss hat. Zum ersten Mal treten hier Komplexbildung bei sehr niedrigem pH-Wert 3 auf. Der Extinktionswert fällt ohne Immunkomplexe auf 74% des Ausgangswertes, wird durch Immunkomplexe nach der Testsubstanzzugabe (Ansatz Nr.9) minimal auf 73% verstärkt.

#### 4.1.6 Versuch 6: Das zu einem Teil positiv geladene, hydrophile und zu einem Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 1:1 (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4024)

Das hier zum Einsatz kommende Polymer besteht aus der positiv geladenen, hydrophilen Aminosäure Lysin (isoelektrischer Punkt bei pH 9,59) und der unpolaren, hydrophoben Aminosäure Alanin, die eine aliphatische (gerade oder verzweigte Kohlenstoffkette) Seitenkette besitzt und deren isoelektrischer Punkt bei pH 6,00 liegt.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,130	0,146	0,142	0,113	0,150	0,162	0,123	0,147	0,138
2. Tag	0,042	0,134	0,137	0,020	0,125	0,169	0,019	0,125	0,141
5. Tag	0,047	0,111	0,137	0,022	0,076	0,158	0,018	0,084	0,135
10. Tag	0,074	0,098	0,135	0,050	0,068	0,150	0,039	0,065	0,118

Tabelle 13: Messergebnisse von Poly-Lysin-Alanin 1:1 bei Variation der Immunkomplexzugabe

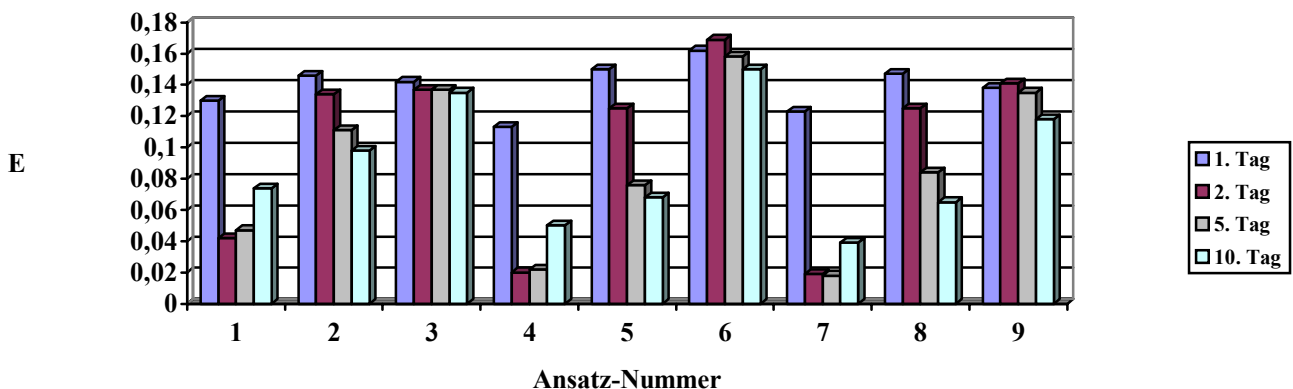


Abbildung 7: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Alanin 1:1

In dieser Konstellation ist die größte Präzipitationstendenz in Versuch Nr. 7 festzustellen. Die Zugabe des Polymers vor den Immunkomplexen bewirkt einen Abfall von Cholesterin auf 15% am zweiten Tag nach Versuchsbeginn. Ähnliche Ergebnisse (Abfall auf 18% ebenfalls am fünften Tag) zeigt Nummer 4, die Immunkomplexe wurden hier zuerst in den Ansatzbehälter zugegeben und für zehn Minuten inkubiert. Das Heteropolymer alleine ist ebenfalls in der Lage, die Extinktion zu schwächen.

Die Zugabe von 0,1 molarer Salzsäure vermindert die präzipitierenden Effekte in Abhängigkeit der Menge. Während bei einem pH-Wert von 5 noch leichte Aggregationsneigung zwischen

den Reaktionspartnern besteht, kommt sie im noch saureren Milieu fast vollständig zum Erliegen.

#### 4.1.7 Versuch 7: Das zu drei Teilen positiv geladene, hydrophile und zu einem Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 3:1 (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1151)

Im Vergleich zum vorausgehenden Versuch variiert hier nur das Molekülverhältnis, das hydrophile Lysin überwiegt mit drei Teilen über das unpolare Alanin.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,117	0,124	0,131	0,120	0,132	0,129	0,111	0,155	0,115
2. Tag	0,117	0,127	0,137	0,113	0,038	0,125	0,105	0,019	0,044
5. Tag	0,119	0,102	0,122	0,112	0,029	0,115	0,106	0,016	0,026
10. Tag	0,118	0,101	0,112	0,111	0,026	0,113	0,107	0,011	0,025

Tabelle 14: Messergebnisse von Poly-Lysin-Alanin 3:1

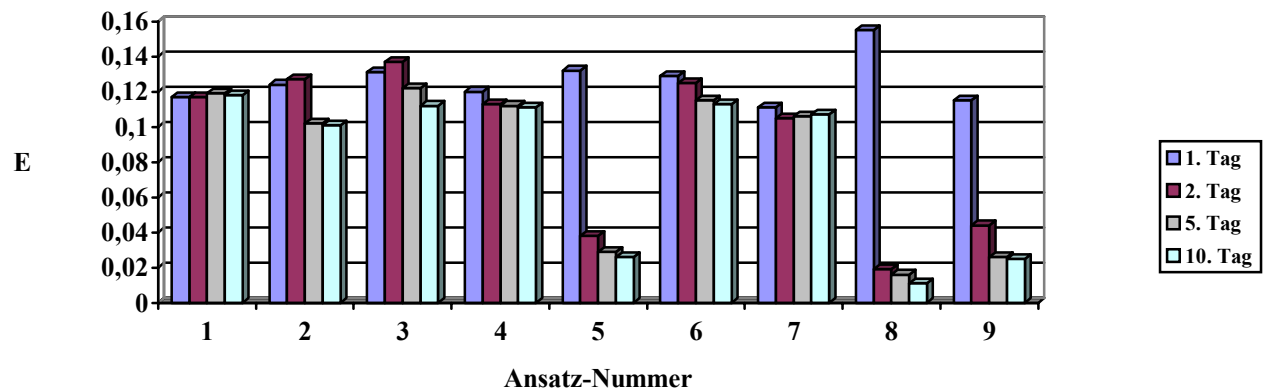


Abbildung 8: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Alanin 3:1

Dieser Versuch zeigt eine deutliche Präzipitationstendenz unter Anwesenheit von Immunkomplexen, während ihr Fehlen zu weitgehend stabilen intermolekularen Kräfteverteilungen führt. Die stärksten Einwirkungen erfährt das System bei einem pH-Wert von 5 unter Anwesenheit von Immunkomplexen, die dem Versuchsansatz nach der Testsubstanz zugegeben wurden. Hier fällt die am ersten Tag gemessene Ausgangsextinktion auf einen Wert von 8%, die umgekehrte Zugabe lässt den Messwert auf 16% absinken. In Versuch Nr. 9, der unter sehr sauren Bedingungen abzulaufen hatte,

kommt es zu einer in diesem pH-Bereich isolierten Reaktion. Im Vergleich zu den Ansätzen Nr. 3 und 6 bilden sich die den Cholesterolgehalt des Überstandes vermindern Immun-

komplex-Lipoproteinvesikel nur unter der Voraussetzung, dass die Testsubstanz vor den Komplexen auf das System einwirkt. Es kommt zur Abnahme der Ausgangsextinktion auf 22% am zehnten Tag.

#### 4.1.8 Versuch 8: Das zum Teil positiv geladene, zum Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 5209)

Ansatz.Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,116	0,122	0,126	0,114	0,138	0,135	0,113	0,069	0,124
2. Tag	0,112	0,114	0,113	0,090	0,103	0,127	0,085	0,111	0,109
5. Tag	0,107	0,110	0,117	0,086	0,097	0,123	0,090	0,099	0,113
10. Tag	0,111	0,102	0,109	0,094	0,084	0,122	0,098	0,087	0,105

Tabelle 15: Messergebnisse von Poly-Lysin-Alanin bei Variation der Immunkomplexzugabe

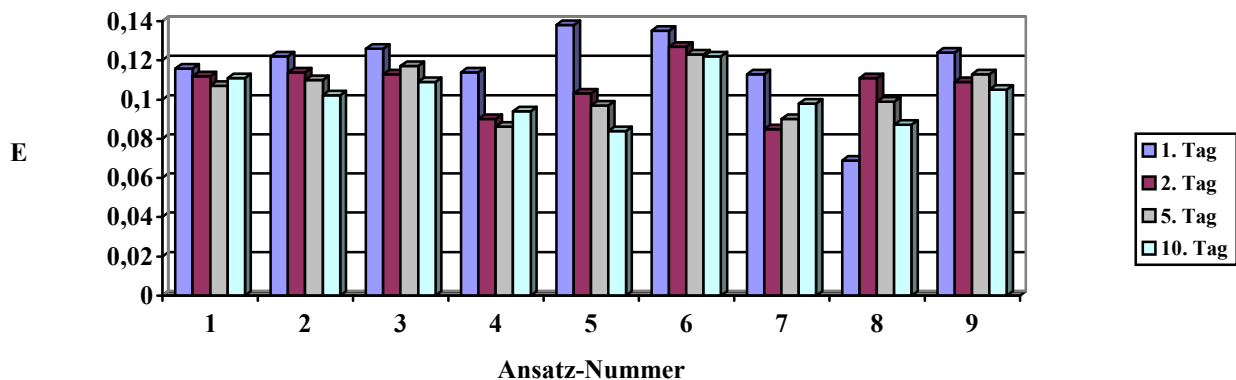


Abbildung 9: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Alanin

Die hier vorliegende Aminosäuresequenz hat in allen drei Versuchsabschnitten nur geringe Auswirkungen auf die Plasmacholesterolkonzentration. Die intermolekularen Anziehungskräfte werden insofern beeinflusst, als dass sowohl in physiologischen als auch in niedrigeren pH-Bereichen es kaum zu Fällungserscheinungen kommt, der größte Effekt tritt in Versuch Nr. 5 nach 48 Stunden auf und bewirkt eine Extinktionsabnahme des Probenansatzes um 39%.

## **4.2 Wirkung des kationischen Polypeptids L-Lysin auf die Stabilität von Serumcholesterin bei Variation der Immunkomplexzugabe und Zusatz von Trichloressigsäure, Glutaraldehyd und Polyvinylpropylen**

Die nachfolgend aufgeführten Ansätze Nr.9-13 wurden dem Pipettierschema Versuchstyp 2 entsprechend hergestellt.

### **4.2.1 Versuch 9: Das positiv geladene Polypeptid Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 1 000–4 000 Dalton (Sigma-Chem. Nr P 0879)**

In diesem Versuch wird der Einfluss von Lysin auf die Stabilität von Serumcholesterin untersucht. Die Hydrophobizität des Moleküls wird durch Zugabe in ihrer Stärke variierender hydrophober Substanzen wie Trichloressigsäure (TCA), Glutaraldehyd (GA) beeinflusst. Weiterhin findet das die Dielektrizitätskonstante beeinflussende Polyvinylpropylen (PVP) Verwendung, so dass ihre Auswirkungen auf die Serumstabilität und die Präzipitationsneigung überprüft werden können.

Versuchsansatz I wird ohne Immunkomplexzugabe durchgeführt:

I.Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	pH 7				pH5			
	Lysin	+TCA	+GA	+PVP	Lysin	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,105	0,109	0,107	0,111	0,109	0,111	0,121	0,110
<b>2. Tag</b>	0,106	0,112	0,106	0,107	0,108	0,110	0,123	0,108
<b>5. Tag</b>	0,105	0,108	0,111	0,105	0,114	0,108	0,123	0,114
<b>10. Tag</b>	0,116	0,126	0,141	0,135	0,137	0,140	0,155	0,144

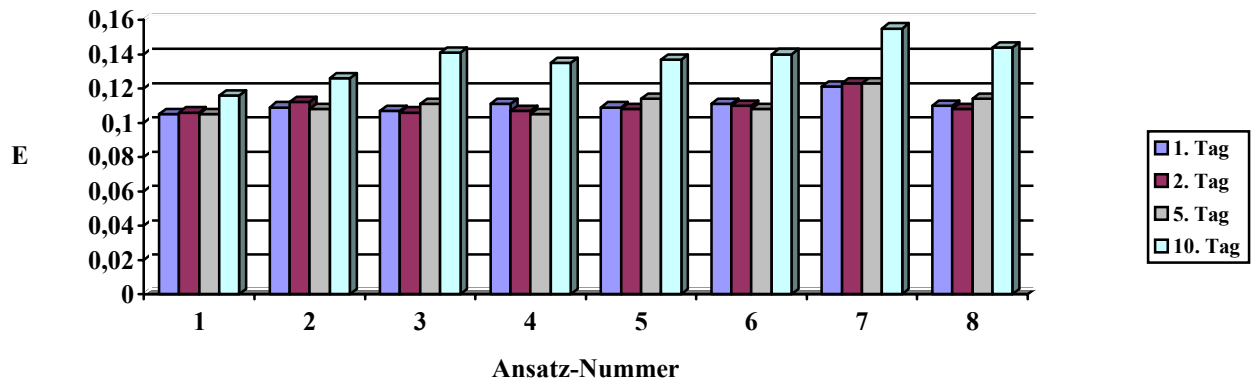
**Tabelle 16:** Messergebnisse für Poly-L-Lysin ohne Immunkomplexzugabe

Versuchsansatz II wird mit Immunkomplexzugabe durchgeführt (Inkubationszeit 10 min):

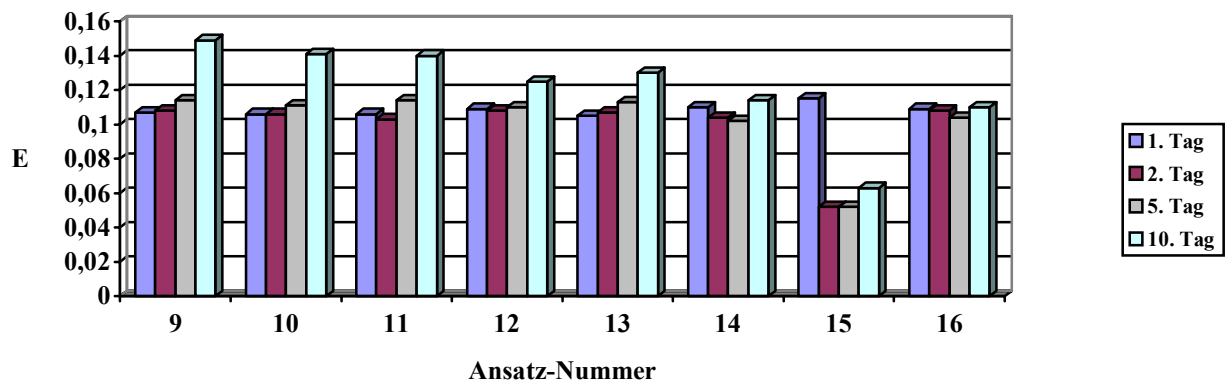
II.Ansatz	9	10	11	12	13	14	15	16
	pH 7				pH5			
	Lysin	+TCA	+GA	+PVP	Lysin	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,107	0,106	0,106	0,109	0,105	0,110	0,115	0,109
<b>2. Tag</b>	0,108	0,106	0,103	0,108	0,107	0,104	0,052	0,108
<b>5. Tag</b>	0,114	0,111	0,114	0,110	0,113	0,102	0,052	0,104
<b>10. Tag</b>	0,149	0,141	0,140	0,125	0,130	0,114	0,063	0,110

**Tabelle 17:** Messergebnisse für Poly-L-Lysin mit Immunkomplexzugabe

Graphische Darstellung der Messergebnisse:



**Abbildung 10:** Extinktionsverlauf von von Poly-L-Lysin 1000-4000 mit Immunkomplexzugabe



**Abbildung 11:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 1000-4000 ohne Immunkomplexzugabe

Wenn man zunächst beide Versuchsansätze im Überblick vergleicht, so stellen sich die Säulendiagramme in annähernd identischer Weise dar. In fast allen Ansätzen bestehen ausgeglichene intermolekulare Kräfteverhältnisse, so dass es hier zu keinen oder geringen Fällungsercheinungen kommen kann. In diesem System zeigten also die hier verwendeten Immunkomplexe bis auf eine Ausnahme keine serumdestabilisierende Wirkung ( fehlende Extinktionsabnahme in den Überständen), daran konnte weder der Zusatz die die Hydrophobizität verstärkenden Substanz TCA noch die Beeinflussung der Dielektrizitätskonstante durch PVP etwas ändern.

Allein Versuch Nr. 15 bietet eine isolierte Präzipitationsneigung. Das hier verwendete Glutaraldehyd bewirkt zusammen mit Immunkomplexen und dem Heteropolymer einen Abfall der Cholesterinfraktion aus dem Überstand auf 46% nach 48 Stunden.

**4.2.2 Versuch 10: Das positiv geladene Polymer Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 15 000 – 30 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr P 7890)**

Im diesem Versuch wurde, bezogen auf Versuch Nr.10, lediglich das Molekulargewicht der Testsubstanz erhöht.

Messergebnisse von Versuchsansatz I ohne Immunkomplexzugabe:

I.Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	pH 7				pH5			
	Lysin	+TCA	+GA	+PVP	Lysin	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,110	0,107	0,108	0,108	0,111	0,109	0,158	0,111
<b>2. Tag</b>	0,109	0,070	0,102	0,103	0,077	0,047	0,038	0,057
<b>5. Tag</b>	0,112	0,075	0,107	0,103	0,106	0,100	0,075	0,058
<b>10. Tag</b>	0,106	0,079	0,107	0,108	0,081	0,064	0,033	0,071

**Tabelle 18:** Messergebnisse für Poly-L-Lysin ohne Immunkomplexzugabe

Messergebnisse von Versuchsansatz II (die Immunkomplexzugabe erfolgt nach einer Inkubationszeit von 10 min):

II.Ansatz	9	10	11	12	13	14	15	16
	pH 7				pH5			
	Lysin	+TCA	+GA	+PVP	Lysin	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,110	0,104	0,110	0,115	0,073	0,088	0,156	0,109
<b>2. Tag</b>	0,114	0,102	0,049	0,111	0,035	0,038	0,025	0,029
<b>5. Tag</b>	0,105	0,054	0,105	0,095	0,039	0,039	0,022	0,028
<b>10. Tag</b>	0,104	0,060	0,109	0,099	0,047	0,055	0,019	0,042

**Tabelle 19:** Messergebnisse für Poly-L-Lysin mit Immunkomplexzugabe

Im Überblick stellt sich das Ausmaß der Extinktionsabnahme in den Probenüberständen unter Anwesenheit von Immunkomplexen verstärkt dar. Das höhere Molekulargewicht der Testsubstanz bewirkt eine deutliche Verstärkung der Aggregationsneigung von Immunkomplex-Lipoproteinvesikeln.

Die Testsubstanz alleine beeinflusst die Stabilität des Plasmamodells am deutlichsten in Versuch Nr.7, in dem sie den am ersten Tag gemessenen Extinktionswert um 75% nach 48 Stunden sinken lässt. In dem Versuchsbehälter, der zusätzlich noch Immunkomplexe enthält, sonst aber aus identischen Inhaltsstoffen hergestellt wurde, fällt der Ausgangswert um 87% ab. Die beteiligte modulierende Sustanz ist das Glueraldehyd, das zur Schwächung der Hydrathülle verwendet wird.



Graphische Darstellung der in Tabelle 12 aufgeführten Messwerte:

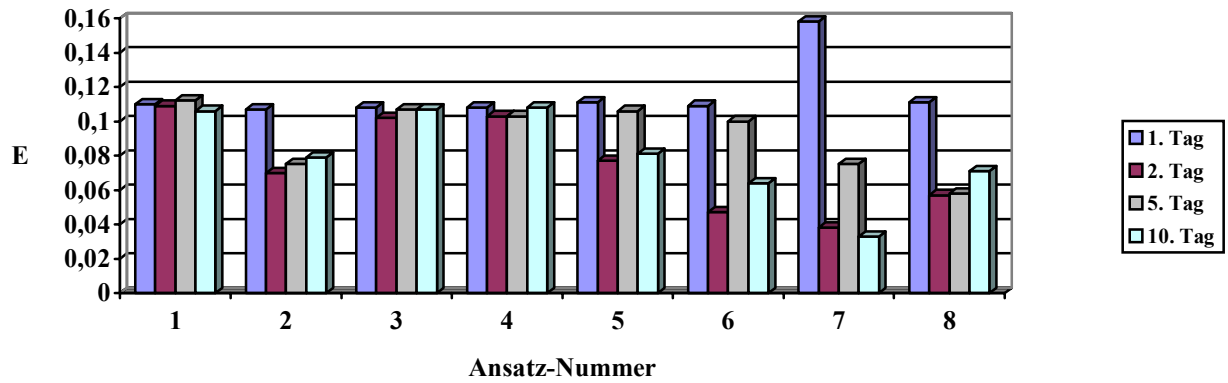


Abbildung 12 Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 ohne Immunkomplexzugabe

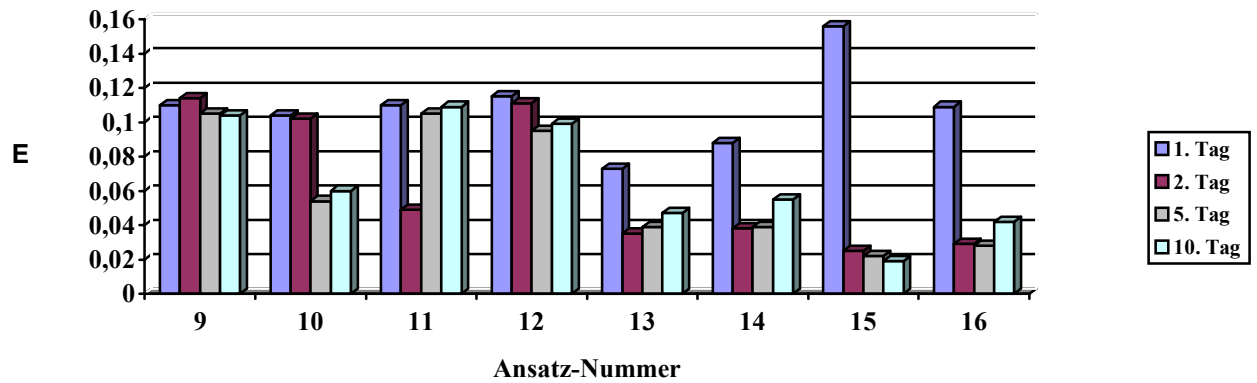


Abbildung 13. Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 mit Immunkomplexzugabe

**4.2.3 Versuch 11: Das positiv geladene, hydrophile Polymer Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht zwischen 150 000 – 300 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr P 1399)**

Durch nochmalige Erhöhung des Molekulargewichtes der Testsubstanz Lysin soll der Einfluss des Vorhandenseins hydrophober reaktiver Seitenketten auf die Plasmastabilität des Versuchssystems untersucht werden.

Messergebnisse von Versuchsansatz I ohne Immunkomplexzugabe:

Ansatz-Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8
	pH 7				pH5			
	Lysin	+TCA	+GA	+PVP	Lysin	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,145	0,168	0,175	0,166	0,180	0,193	0,190	0,175
<b>2. Tag</b>	0,102	0,094	0,090	0,088	0,098	0,099	0,093	0,095
<b>5. Tag</b>	0,102	0,103	0,098	0,105	0,108	0,108	0,111	0,105
<b>10. Tag</b>	0,095	0,097	0,102	0,097	0,102	0,098	0,102	0,098

**Tabelle 20:** Messergebnisse von Poly-L-Lysin ohne Immunkomplexzugabe

Messergebnisse von Versuchsansatz II (die Immunkomplexzugabe erfolgt nach einer Inkubationszeit von 10 min):

Ansatz-Nummer	9	10	11	12	13	14	15	16
	pH 7				pH5			
	Lysin	+TCA	+GA	+PVP	Lysin	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,222	0,176	0,171	0,169	0,168	0,144	0,175	0,175
<b>2. Tag</b>	0,107	0,102	0,090	0,096	0,043	0,010	0,005	-0,005
<b>5. Tag</b>	0,089	0,108	0,107	0,106	0,045	0,011	0,003	0,015
<b>10. Tag</b>	0,101	0,100	0,102	0,093	0,051	0,003	-0,003	0,010

**Tabelle 21:** Messergebnisse von Poly-L-Lysin mit Immunkomplexzugabe

Bei diesem Versuch wird ein weiterer Unterschied zwischen Ansätzen mit und ohne Immunkomplexgehalt deutlich:

Während der am stärksten ausgeprägte Extinktionsabfall in den Versuchen Nr.1-8 regelmäßig nach 48 Stunden stattfindet, kann das Phänomen unter Anwesenheit von Immunkomplexen (Versuch Nr. 9-16) erst am fünften Tag nach Probenansatz beobachtet werden.

Die optimalsten Präzipitationsbedingungen finden sich im saueren Milieu bei pH 5, wobei die Zugabe von Glutaraldehyd (Versuch Nr.15) und von PVP (Versuch Nr.16) zur Abnahme der Ausgangswerte auf unter 0% führt. Die negativen Werte kommen durch photometrische Erfassung von Plasmabestandteilen zustande, die nach vollständigem Verschwinden von Cholesterol aus dem Überstand das Messergebnis beeinflussen können.

Graphische Darstellung der Ergebnisse von Versuch-Nr.11:

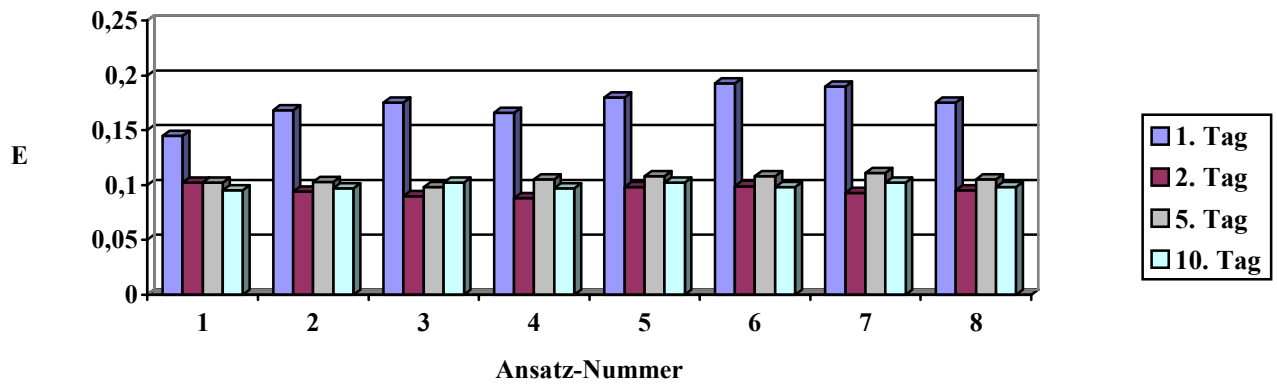


Abbildung 14: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 ohne Immunkomplexzugabe

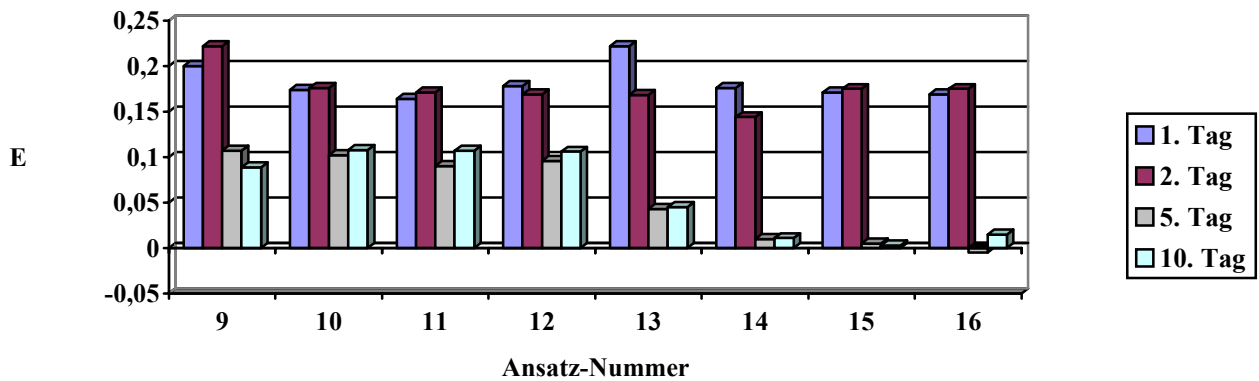


Abbildung 15: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 mit Immunkomplexzugabe

**4.2.4 Versuch 12: Das zu einem Teil positiv geladene und zu einem Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 1:1 (Sigma-Chem. Produkt-Nr P 4024)**

Messergebnisse von Versuchsansatz I ohne Immunkomplexzugabe:

I.Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	pH 7				pH5			
	Lys-Ala	+TCA	+GA	+PVP	Lys-Ala	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,118	0,102	0,118	0,102	0,112	0,113	0,128	0,109
<b>2. Tag</b>	0,111	0,038	0,118	0,068	0,058	0,059	0,044	0,046
<b>5. Tag</b>	0,127	0,055	0,096	0,083	0,069	0,066	0,059	0,057
<b>10. Tag</b>	0,127	0,063	0,088	0,088	0,074	0,077	0,066	0,070

**Tabelle 22:** Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 ohne Immunkomplexzugabe

Messergebnisse von Versuchsansatz II (die Immunkomplexzugabe erfolgt nach einer Inkubationszeit von 10 min):

II.Ansatz	9	10	11	12	13	14	15	16
	pH 7				pH5			
	Lys-Ala	+TCA	+GA	+PVP	Lys-Ala	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,106	0,100	0,130	0,102	0,071	0,102	0,124	0,084
<b>2. Tag</b>	0,058	0,025	0,097	0,051	0,026	0,034	0,027	0,047
<b>5. Tag</b>	0,071	0,032	0,068	0,060	0,037	0,038	0,030	0,040
<b>10. Tag</b>	0,077	0,062	0,100	0,086	0,049	0,043	0,029	0,043

**Tabelle 23:** Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 mit Immunkomplexzugabe

In Ansatz Nr.1 wirkt das Heteropolymer isoliert auf das Modellsystem und vermag keine Plasmadetabilisierung auszulösen. Es kommt zu einer Anreicherung von Cholesterin im Überstand, was als „Aufschwimmeffekt“ bezeichnet werden kann. In allen anderen Versuchen findet sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte Präzipitationsneigung, die durch Anwesenheit von Immunkomplexenerneuert verstärkt werden kann.

Die Zugabe von 0,1 molarer Salzsäure und die dadurch erreichte Absenkung des pH-Wertes trägt zusätzlich zur Instabilitätstendenz des Systems bei.

Fügt man nun noch die modulierenden Zusatzsubstanzen bei, so kommt es zur Abnahme um 63% bei Zugabe von Lysin-Alanin +IC nach 48 Stunden, um 66% bei Zugabe von Lysin-Alanin+IC+TCA, um 78% bei Zugabe von Lysin-Alanin+IC+GA nach jeweils 48 Stunden und um 52% bei Zugabe von Lysin-Alanin+IC+PVP nach fünf Tagen.

Graphische Darstellung der Ergebnisse von Versuch-Nr.12:

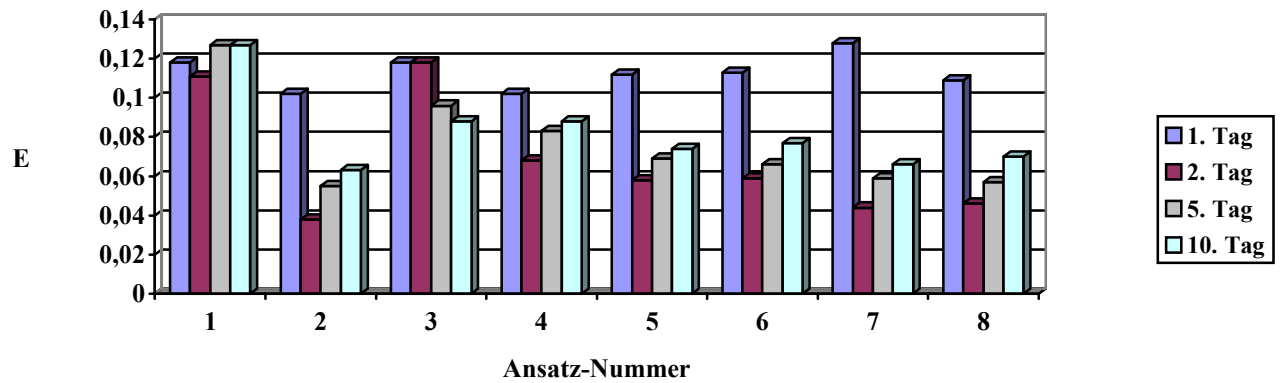


Abbildung 16: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 ohne Immunkomplexzugabe

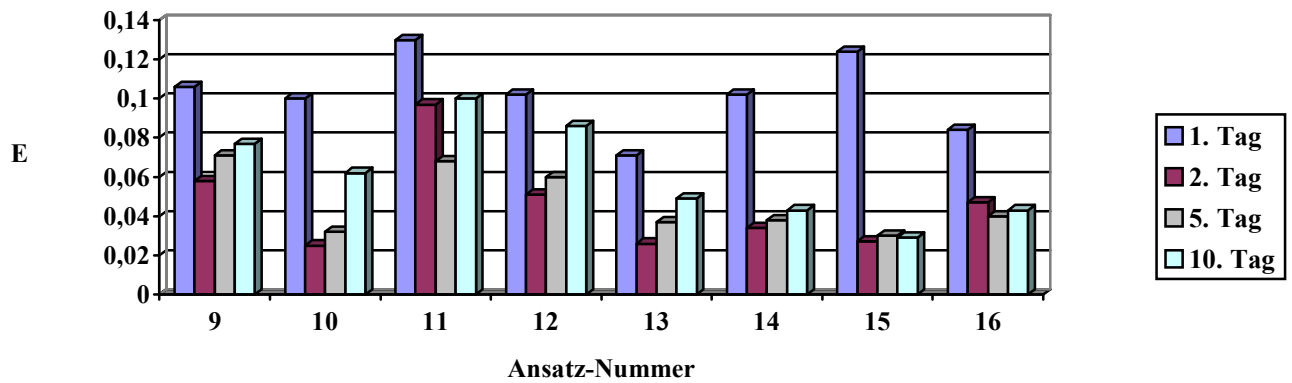


Abbildung 17: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 mit Immunkomplexzugabe

**4.2.5 Versuch 13: Das zum Teil positiv geladene, hydrophile und zum Teil hydrophobe Heteropolymer Poly-Lysin-Alanin mit einem Molekulargewicht von 5000–15 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr P 5209)**

Messergebnisse von Versuchsansatz I ohne Immunkomplexzugabe:

I.Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	pH 7				pH5			
	LysAla	+TCA	+GA	+PVP	LysAla	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,102	0,103	0,098	0,102	0,103	0,100	0,106	0,096
<b>2. Tag</b>	0,105	0,105	0,104	0,108	0,105	0,097	0,108	0,100
<b>5. Tag</b>	0,105	0,105	0,101	0,092	0,113	0,095	0,111	0,093
<b>10. Tag</b>	0,103	0,095	0,098	0,100	0,101	0,096	0,097	0,093

**Tabelle 24:** Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin ohne Immunkomplexzugabe

Messergebnisse von Versuchsansatz II (die Immunkomplexzugabe erfolgt nach einer Inkubationszeit von 10 min):

II.Ansatz	9	10	11	12	13	14	15	16
	pH 7				pH5			
	LysAla	+TCA	+GA	+PVP	LysAla	+TCA	+GA	+PVP
<b>1. Tag</b>	0,101	0,105	0,103	0,095	0,100	0,105	0,113	0,088
<b>2. Tag</b>	0,096	0,087	0,104	0,103	0,085	0,071	0,075	0,071
<b>5. Tag</b>	0,096	0,088	0,100	0,091	0,084	0,075	0,075	0,070
<b>10. Tag</b>	0,095	0,090	0,097	0,098	0,083	0,071	0,071	0,066

**Tabelle 25:** Messergebnisse Poly-L-Lysin-Alanin mit Immunkomplexzugabe

Die in der untenstehenden Graphik dargestellten Ergebnisse geben ein relativ stabiles Bild ohne bemerkenswerte Änderung der Extinktionen in der Versuchsreihe Nr.1-8. Die Einwirkung der Immunkomplexe sowie des pH-Wertes als auch der modulierenden Substanzen sind im Vergleich zu den Vorversuchen deutlich abgeschwächt, finden jedoch trotzdem statt: erneut kann Glutaraldehyd als wirkungsvollster Auslöser einer Präzipitationsreaktion festgestellt werden. Der Abfall der Ausgangsextinktion läuft gemäßigt auf einen Wert von 62% am zehnten Tag zu, es schließen sich Trichloressigsäure mit 68% und PVP mit 75% Extinktionsänderung bei Anwesenheit von IC an.

Graphische Darstellung der Ergebnisse von Versuch-Nr.13:

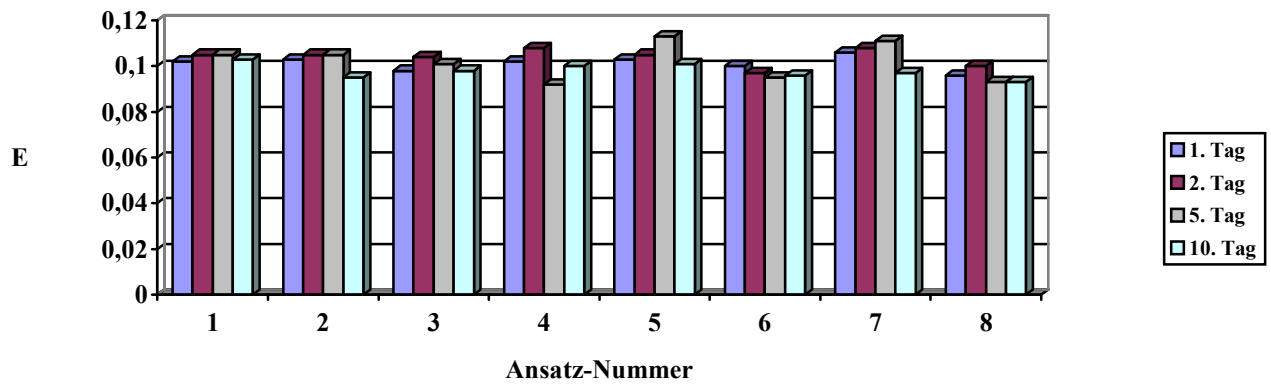


Abbildung 18: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 5000-15000 ohne Immunkomplexzugabe

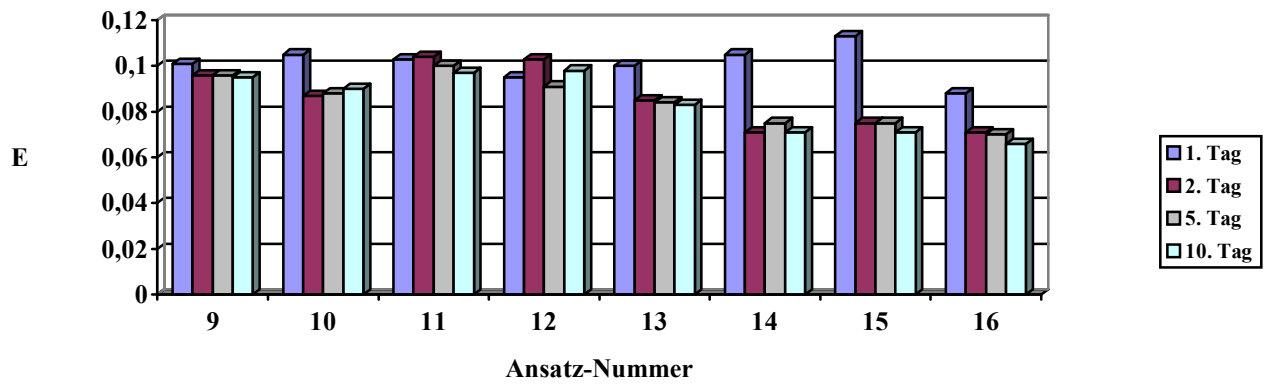


Abbildung 19: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 5000-15000 mit Immunkomplexzugabe

### 4.3 Versuche mit Glutamin

#### 4.3.1 Versuch 14: Das ungeladene Polypeptid Poly N<sup>5</sup>-3-Hydroxypropyl-L-Glutamin mit einem Molekulargewicht zwischen 40 000 und 60 000 Dalton

(Sigma-Chem. Produkt-Nr P 1899)

Die Aminosäure Glutamin ist Baustein fast aller Proteine. In freier Form spielt es im Stickstoffmetabolismus eine zentrale Rolle. Glutamin bildet sich im Organismus aus Glutamat und Ammoniak unter ATP-Verbrauch und ist daher vielfach die Transport-, Entgiftungs- und Speicherform von Ammoniak. Der isoelektrische Punkt der AS liegt bei pH 5,56.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
<b>1. Tag</b>	0,097	0,095	0,095	0,099	0,102	0,116	0,100	0,097	0,098
<b>2. Tag</b>	0,108	0,106	0,104	0,110	0,102	0,109	0,108	0,105	0,106
<b>5. Tag</b>	0,111	0,108	0,108	0,110	0,102	0,121	0,107	0,102	0,109
<b>10. Tag</b>	0,108	0,091	0,102	0,109	0,083	0,117	0,107	0,086	0,108

Tabelle 26: Messergebnisse von Poly-L-Glutamin

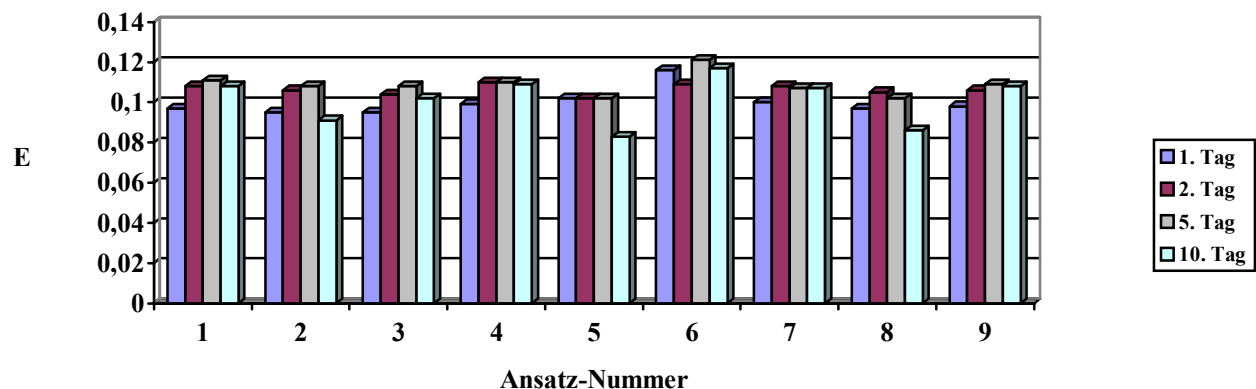


Abbildung 20: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin

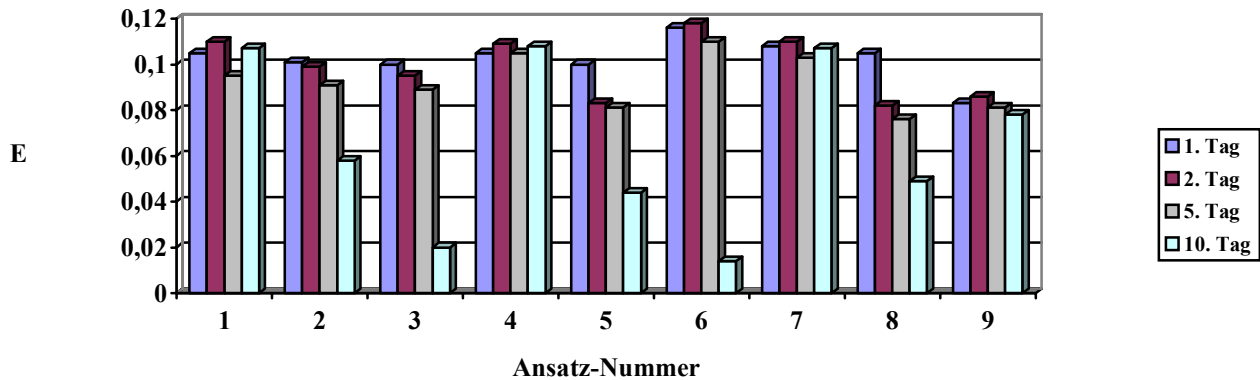
Ohne die Anwesenheit von Immunkomplexen kommt in den Ansätzen Nr.1-3 zu einem „Aufschwimmeffekt“ des Cholesterols im Überstand. In den Ansätzen Nr. 4, 6, 7 und 9 sind ähnliche Effekte festzustellen. Zu Präzipitationserscheinungen kommt es lediglich in Versuch-Nr. 5 und 8, wobei die gemessenen Extinktionsabnahmen nur sehr schwach ausgeprägt erscheinen (Abfall auf 82%, bzw 89%) und jeweils bei pH 5 stattfinden.



**4.3.2 Versuch 15: Das ungeladene Heteropolymer Poly-Glutamin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 und einem Molekulargewicht zwischen 20000 und 50000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr P 0275)**

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne Ic			Ic vor Ts			Ts vor Ic		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
<b>1. Tag</b>	0,105	0,101	0,100	0,105	0,100	0,116	0,108	0,105	0,083
<b>2. Tag</b>	0,110	0,099	0,095	0,109	0,083	0,118	0,110	0,082	0,086
<b>5. Tag</b>	0,095	0,091	0,089	0,105	0,081	0,110	0,103	0,076	0,081
<b>10. Tag</b>	0,107	0,058	0,020	0,108	0,044	0,014	0,107	0,049	0,078

**Tabelle 27:** Messergebnisse von Poly-Glutamin-Tyrosin 4:1



**Abbildung 21:** Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Tyrosin

Ohne Immunkomplexe kommt es zu einer zunehmenden Präzipitation der Ansätze am jeweils zehnten Tag in Abhängigkeit vom pH-Wert. Tag 1-5 zeigt stabile Verhältnisse des Ansatzes mit wenig Änderung der Extinktion.

In Ansatzreihe Nr. 4-6 verstärkt sich der Trend zu einer verstärkten Präzipitation nach längerer Zeitdauer. Je saurer das Milieu, desto stärker fällt dabei der Niederschlag aus (am deutlichsten Ansatz-Nr. 6 bei pH 3).

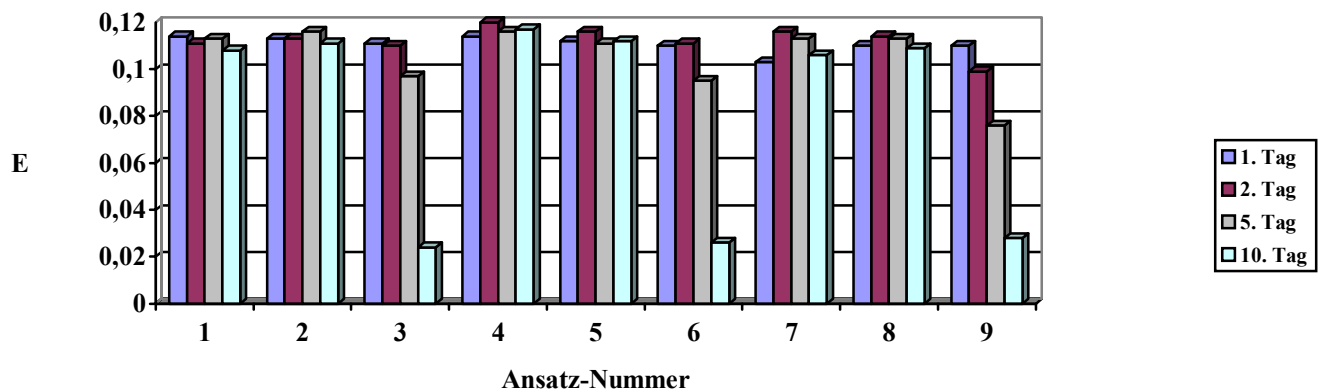
In der Testreihe mit den Nummern 7-9 konnte die Testsubstanz vor den Immunkomplexen mit den Polyproteinen reagieren und es ergeben sich deutlich plasmastabilere Verbindungen. Ergebnis ist ein auch am zehnten Tag verminderter Ausfall der Immunkomplex- Cholesterincluster, wiederum in Abhängigkeit vom pH-Wert und am stärksten bei pH 5 ausgeprägt.

**4.3.3 Versuch 16: Das zu vier Teilen ungeladene und zu einem Teil unpolar-hydrophobe Heteropolymer Glutamin-Leucin in einem Molekülverhältnis von 4:1 und einem Molekulargewicht zwischen 30 000-70 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr P 0812)**

Zusätzlich zu dem schon eingesetzten Glutamin kommt hier die hydrophobe und unpolar Aminosäure Leucin zum Einsatz. Sie besitzt eine aliphatische Seitenkette und ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 5,98.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,114	0,113	0,111	0,114	0,112	0,110	0,103	0,110	0,110
2. Tag	0,111	0,113	0,110	0,120	0,116	0,111	0,116	0,114	0,099
5. Tag	0,113	0,116	0,097	0,116	0,111	0,095	0,113	0,113	0,076
10. Tag	0,108	0,111	0,024	0,117	0,112	0,026	0,106	0,109	0,028

**Tabelle 28:** Messergebnisse von Poly-Glutamin-Leucin



**Abbildung 22:** Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Leucin

Ohne Anwesenheit von Immunkomplexen werden die bis jeweils zum zehnten Tag ausgeprägt stabilen Serum-Polyproteinverbindungen nur im sauersten Ansatz (bei pH-Wert 3) ausreichend gestört. Dann allerdings kommt es zu einer sehr ausgeprägten Präzipitation.

Bei Zugabe der Immunkomplexe vor der Testsubstanz lassen sich: in den ersten beiden Testreihen bei pH 7 und 5 kaum Veränderungen beobachten, allein Versuch Nr 6 bietet am zehnten Tag einen Abfall der Extiktion, so dass auch hier ein Ausfall der sich bis dahin gebildeten Komplexe beobachtet werden kann.

Erfolgt die Zugabe der Testsubstanz vor den Immunomplexen, ergibt sich insgesamt das gleiche Bild wie in Ansatz Nr. 4-6. Allerdings erfolgt der Abfall im sauersten Milieu schon am fünften Tag.

#### 4.3.4 Versuch 17: Das Heteropolymer Poly-Glutamin-Lysin-Tyrosin 6:3:1

(Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4409)

Das eingesetzte Polymer besteht zu 6 Teilen aus der unpolar-hydrophoben Aminosäure Glutamin (IP bei pH 5,65), aus dem basisch-hydrophilen und positiv geladenen Lysin (IP bei pH 9,59) und der aromatischen, ungeladen-polaren Aminosäure Tyrosin (IP bei pH 5,66).

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,117	0,118	0,120	0,120	0,115	0,116	0,117	0,116	0,115
2. Tag	0,118	0,116	0,119	0,119	0,108	0,114	0,116	0,109	0,114
5. Tag	0,114	0,116	0,117	0,118	0,106	0,113	0,115	0,107	0,113
10. Tag	0,112	0,114	0,116	0,117	0,107	0,113	0,111	0,099	0,112

Tabelle 29: Messergebnisse von Poly-Glutamin-Lysin-Tyrosin

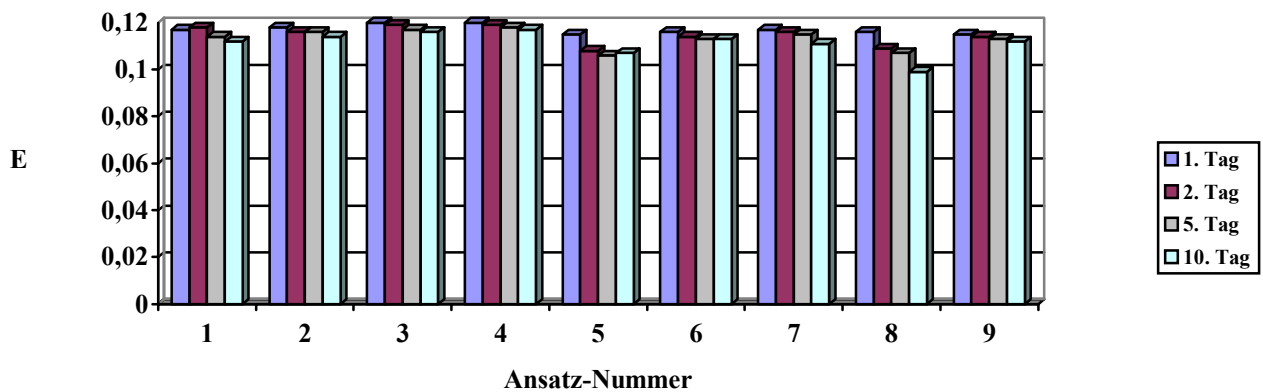


Abbildung 23: Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Leucin-Tyrosin

In allen Ansätzen sind unabhängig von der Immunkomplexanwesenheit oder ihrer der Reihenfolge ihrer Zugabe nur geringfügige Einflussnahme auf die Serumstabilität festzustellen.

#### 4.3.5 Versuch 18: Das Heteropolymer Poly-Glutamin-Alanin 6:4 mit einem Molekulargewicht zwischen 20 000 und 50 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1650)

Die zusammen mit Glutamin zu einem Heteropolymer synthetisierte Aminosäure Alanin hat unpolare und hydrophobe Moleküleigenschaften, ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 6. Es resultiert ein zu sechs Teilen ungeladen-polares, zu vier Teilen hydrophob-unpolares Molekül.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,109	0,114	0,111	0,111	0,103	0,110	0,110	0,112	0,106
2. Tag	0,115	0,113	0,108	0,111	0,085	0,096	0,112	0,106	0,093
5. Tag	0,111	0,111	0,095	0,110	0,083	0,081	0,111	0,104	0,079
10. Tag	0,099	0,110	0,094	0,097	0,082	0,079	0,110	0,102	0,063

Tabelle 30: Mesergebnisse von Poly-Glutamin-Alanin 6:4

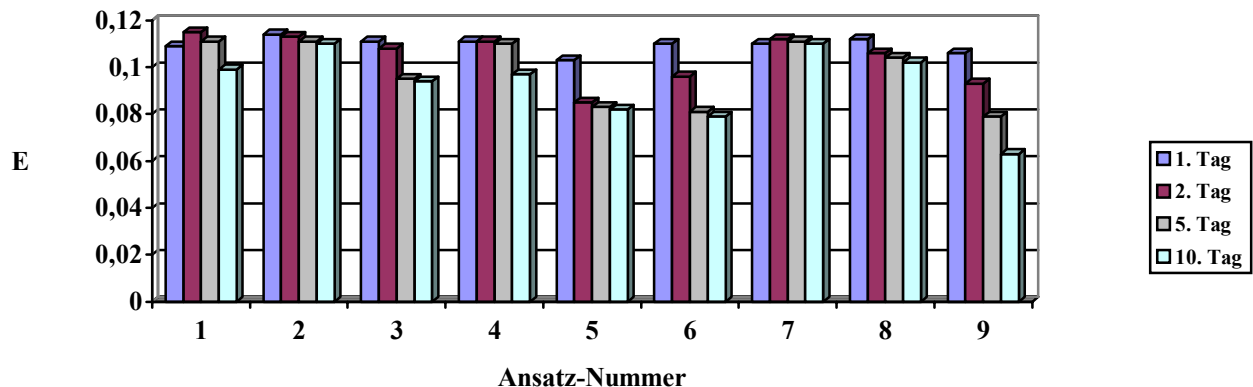


Abbildung 24: Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Alanin 6:4

Die Testsubstanz alleine vermag nur ein leichtes Absinken der Cholesterinfraktion aus dem Überstand zu bewirken. Die Fällungserscheinungen treten bei physiologischem pH in etwa gleicher Intensität wie bei pH 3 auf und senken die am ersten Tag gemessene Extinktion auf 85%. Betrachtet man die Ansätze, denen Immunkomplexe zugesetzt wurden, so können die deutlichsten Auswirkungen in Ansatz Nr.9 beobachtet werden. Hier wurden dem Plasmamodell zuerst die Testsubstanz und nach einer Inkubationszeit von 10 min die Immunkomplexe zugesetzt. Es erfolgt ein kontinuierliches Absinken des Cholesterolgehaltes aus dem Überstand des Probengefäßes auf einen Endwert von 60%. Ähnlich stark ist die Aggregationsnei-

gung in Ansatz Nr.6 ausgeprägt, der dem zuvor beschriebenen bis auf die Reihenfolge der Substanzzugabe entspricht.

#### 4.4 Versuche mit Glutaminsäure

##### 4.4.1 Versuch 19: Das negativ geladene, saure Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht von 600 Dalton (Sigma-Chem.-Produkt-Nr. P 1943)

Auch die negativ geladene Glutaminsäure ist Baustein fast aller Proteine, ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 3,22.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
<b>1. Tag</b>	0,098	0,107	0,105	0,110	0,112	0,107	0,107	0,104	0,101
<b>2. Tag</b>	0,101	0,114	0,109	0,108	0,117	0,113	0,113	0,115	0,112
<b>5. Tag</b>	0,097	0,112	0,104	0,106	0,109	0,102	0,111	0,116	0,104
<b>10. Tag</b>	0,094	0,109	0,088	0,105	0,106	0,051	0,107	0,108	0,034

Tabelle 31: Messergebnisse von Poly-L-Glutaminsäure

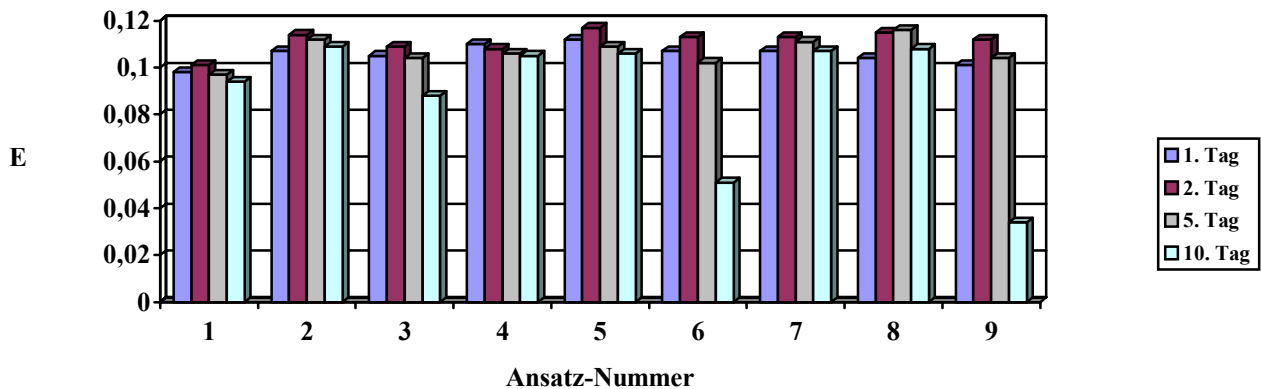


Abbildung 25: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure

Der sehr niedrig liegende IP dieser Aminosäure hat deutlich sichtbare Auswirkungen auf das Reaktionsverhalten in unserem Modellsystem. Während bei höheren pH-Werten kaum Auswirkungen auf die Plasmastabilität auszumachen sind, zeigt sich in den Ansätzen Nr.3,6 und 9 ein in dieser Reihenfolge zunehmend ausgeprägte Abnahme der zu Beginn der Testreihe gemessenen Werte. Das Polymer alleine vermag eine Änderung der Extinktion auf 84% auszulösen, kommen die Immunkomplexe zuerst in den Behälter, so sinkt der Wert auf 48% und erfolgt die Zugabe in umgekehrter Weise, so ergibt sich ein Absinken auf 34%. Diese Messwer-

te konnten jeweils am zehnten Tag registriert werden, in der Zeit zuvor präsentierten sich eine verhältnismäßig stabile Plasmakonstitution.

#### 4.4.2 Versuch 20: Das negativ geladene, saure Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 2 000 und 15 000 Dalton (Sigma-Chem.-Produkt-Nr. P 4636)

Im Vergleich zum vorher stattfindenen Versuch wurde hier eine identische Testsubstanz mit erhöhtem Molekulargewicht verwendet.

Ansatz.Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,117	0,115	0,114	0,117	0,116	0,115	0,117	0,117	0,114
2. Tag	0,115	0,116	0,113	0,117	0,107	0,077	0,117	0,112	0,092
5. Tag	0,116	0,117	0,107	0,116	0,104	0,067	0,115	0,111	0,078
10. Tag	0,115	0,115	0,106	0,115	0,103	0,055	0,113	0,112	0,077

Tabelle 32: Messergebnisse von Poly-L-Glutaminsäure

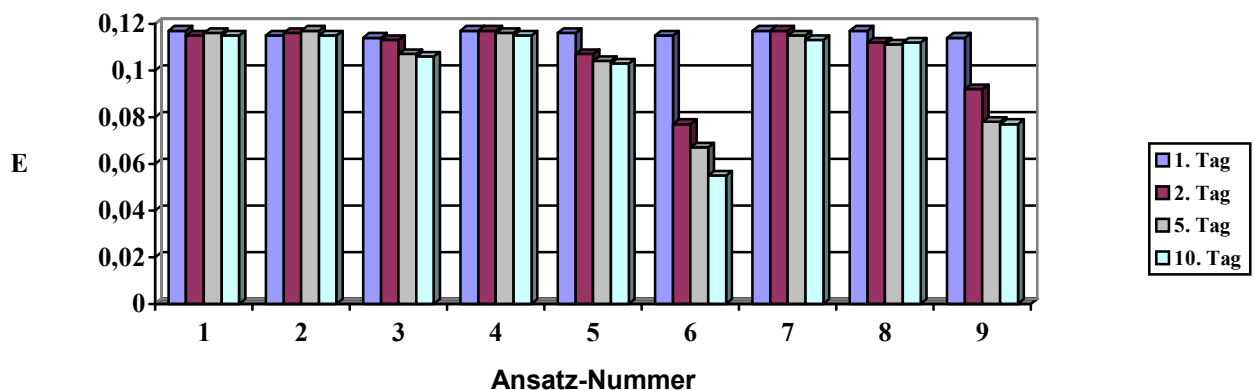


Abbildung 26: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure

Auch in diesem Versuch stellen sich bis auf zwei Ausnahmen unbeeinflussbare Modellkonstellationen dar.

Deutlich ist hier jedoch das Zusammenwirken der Immunkomplexe mit der Glutaminsäure festzustellen. Wie auch in Versuch Nr.19 treten die Aggregationen nur bei pH 3 in Erscheinung, dann jedoch führen sie zu einem ausgeprägten Absinken des Cholesteringehaltes auf 48% in Ansatz-Nr.6 und auf 68% in Ansatz Nr. 9. Der unter gleichen Bedingungen (auf den pH-Wert bezogen) stattfindende Versuch Nr.3 zeigt nur eine minimale Änderung seiner Messwerte, die nicht als Ausfällungserscheinungen gewertet werden können

#### 4.4.3 Versuch 21: Das Polypeptid Poly L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 50 000-100 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4886)

Erneut ist das Molekulgewicht der Parameter, der hier eine Veränderung in Richtung Zunahme erfährt.

Ansatz.Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,110	0,106	0,112	0,101	0,103	0,092	0,095	0,109	0,103
2. Tag	0,113	0,113	0,111	0,103	0,115	0,104	0,112	0,116	0,100
5. Tag	0,115	0,113	0,095	0,099	0,115	0,086	0,107	0,110	0,076
10. Tag	0,102	0,105	0,027	0,097	0,106	0,027	0,101	0,109	0,062

Tabelle 33: Messergebnisse von Poly-L-Glutaminsäure

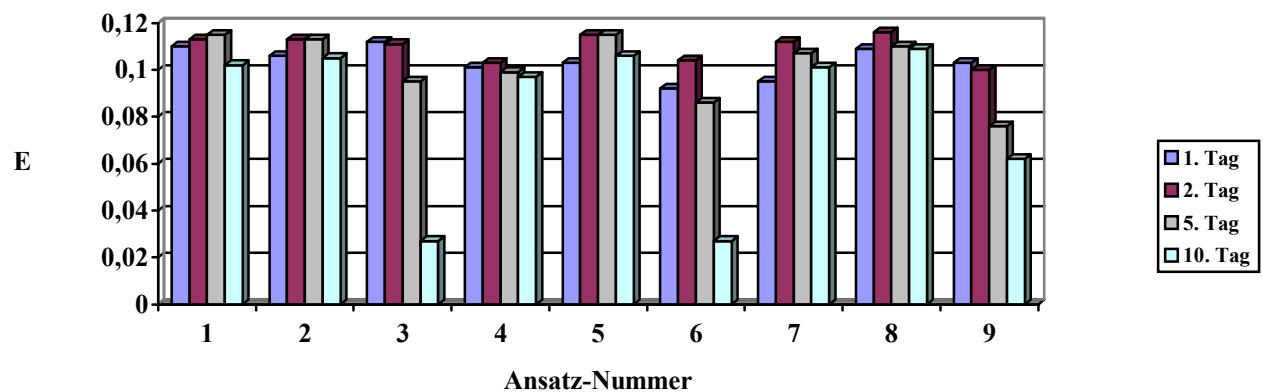


Abbildung 27: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure

Interessanterweise erfahren die schon in den Versuchen Nr. 20 und 21 gemachten Beobachtungen in diesem Ansatz noch eine weitere Verstärkung. Die prinzipiellen Abläufe der Reaktionen haben keinerlei Veränderung erfahren, es kommt lediglich zu kräftigen Extinktionsabnahmen in den Versuchsansätzen Nr. 3,6 und 9. Im Gegensatz zu den Vorläufern jedoch diesmal in umgekehrter Reihenfolge: ohne Immunkomplexe sinkt der Extinktionswert auf 24%, gibt man die Immunkomplexe vor der Glutaminsäure zu, so erreicht man ein Absinken auf 30% und hat die Aminosäure schließlich die zeitlich früheste Reaktionsgelegenheit, so fällt der am ersten Tag gemessene Wert nur noch auf 61%.

## 4.5 Weitere Versuche

### 4.5.1 Versuch 22: Das basisch-polare Polypeptid Poly L-Histidin mit einem Molekulgewicht zwischen 15 000-30 000 Dalton

(Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 2534)

Histidin besitzt eine Imidazol-Seitenkette, die häufig Komponente eines aktiven Zentrums von z.B. Enzymen und Globulinen ist. Der isoelektrische Punkt der Aminosäure liegt bei pH 7,74.

Ansatz-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
<b>1. Tag</b>	0,156	0,146	0,142	0,188	0,148	0,140	0,202	0,151	0,143
<b>2. Tag</b>	0,006	0,126	0,138	0,011	0,088	0,138	0,013	0,093	0,143
<b>5. Tag</b>	0,059	0,165	0,186	0,065	0,131	0,186	0,064	0,131	0,191
<b>10. Tag</b>	0,007	0,105	0,138	0,007	0,074	0,139	0,007	0,074	0,142

Tabelle 34: Messergebnisse von Poly-L-Histidin

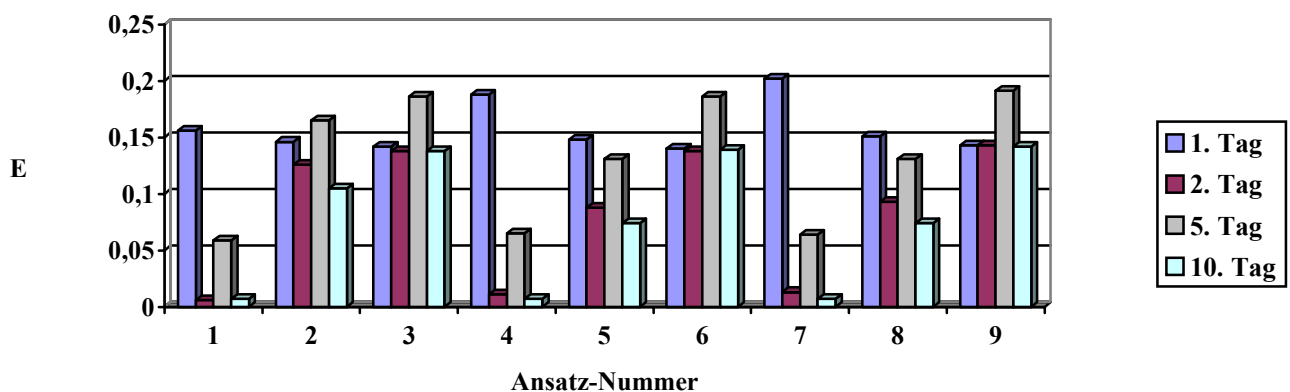


Abbildung 28: Extinktionsverlauf von Poly-L-Histidin

In Ansatz Nr. 1 stellt sich, nach Zugabe nur der Testsubstanz, eine ausgeprägte Präzipitationstendenz nach 48 Stunden dar (4%). Im weiteren Verlauf kommt es am fünften Tag wieder zu einer Anreicherung von Cholesterin im Überstand, bevor der Wert zum Ende der Messzeit wieder auf 5% absinkt. Dieser wellenförmige Kurvenverlauf zieht sich ohne Ausnahme durch alle Versuchsansätze, die Intensität der Ausfällung hängt vom pH-Wert ab. Je höher die  $H_3O^+$ -Ionen-Konzentration ist, desto geringere Auswirkungen haben Testsubstanz und Immunkomplexe auf das Plasmamodell. Immunkomplexe führen auch hier zu einer Verstärkung der Präzipitation.



**4.5.2 Versuch 23: Das ungeladen-hydrophobe Polypeptid Poly-L-Tyrosin mit einem Molekulargewicht zwischen 10 000 und 40 000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1800)**

Der isoelektrische Punkt dieser Aminosäure liegt bei pH 5,66.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,119	0,183	0,186	0,184	0,136	0,128	0,067	0,136	0,141
2. Tag	0,101	0,127	0,133	0,116	0,094	0,101	0,103	0,122	0,120
5. Tag	0,092	0,096	0,099	0,101	0,092	0,101	0,105	0,103	0,094
10. Tag	0,090	0,092	0,101	0,102	0,081	0,102	0,106	0,111	0,081

Tabelle 35: Messergebnisse von Poly-L-Tyrosin

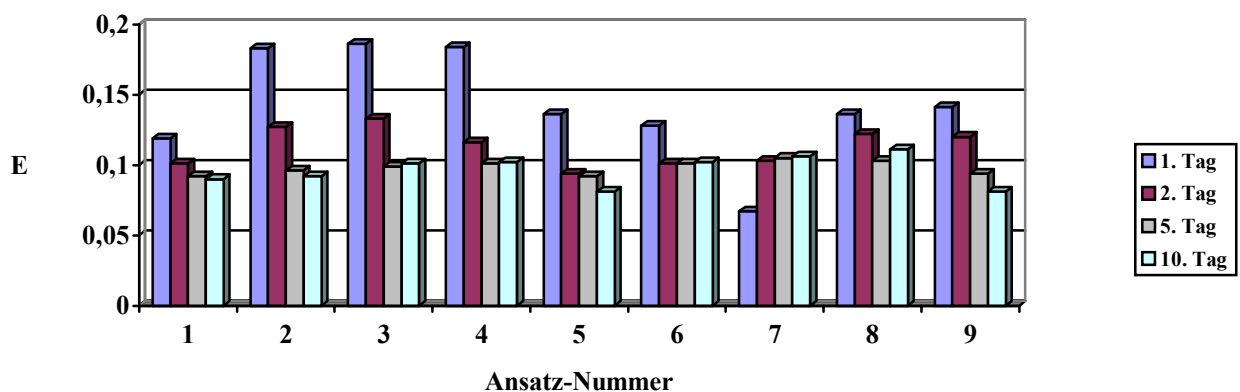


Abbildung 29: Extinktionsverlauf von Poly-L-Tyrosin

Generell ist Tyrosin in der Lage, die Überstands-Lipoproteinfraktion unseres Modellsystems zu beeinflussen. In den meisten Ansatzbehältern kommt es zu einer Abnahme der Extinktion und damit zu einem Absinken der cholesterinhaltigen Vesikel auf den Boden. Im Gegensatz zu vielen anderen unserer Versuchsaufbauten können hier nur schwer eindeutige Trendverläufe festgestellt werden, da sich der Kurvenverlauf –unabhängig von pH-Wert oder Immunkomplexpräsenz- sehr unregelmäßig verhält.

#### 4.5.3 Versuch 24: Das Heteropolymer Poly-Ornithin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von 4:1 (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4534)

Ornithin ist ein Zwischenprodukt des Harnstoffzyklus, in dessen Verlauf Harnstoff aus Ammoniak, Aminstickstoff und CO<sub>2</sub> unter ATP-Verbrauch gebildet wird. An seiner Synthese ist die weiter oben beschriebene L-Glutaminsäure beteiligt.

Ansatz-Nr.:	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ohne IC			IC vor TS			TS vor IC		
	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3	pH 7	pH 5	pH 3
1. Tag	0,137	0,131	0,121	0,141	0,141	0,124	0,148	0,139	0,122
2. Tag	0,054	0,048	0,120	0,041	0,041	0,127	0,038	0,038	0,124
5. Tag	0,044	0,062	0,115	0,030	0,027	0,115	0,029	0,029	0,113
10. Tag	0,025	0,023	0,096	0,010	0,009	0,115	0,011	0,009	0,117

Tabelle 36: Messergebnisse von Poly-Ornithin-Tyrosin

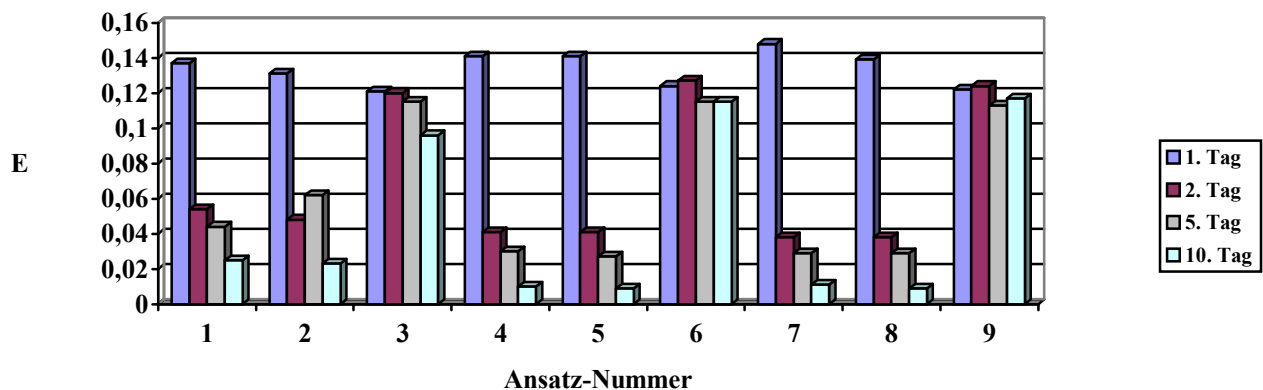


Abbildung 30: Extinktionsverlauf von Poly-Ornithin-Tyrosin

Die in diesem Versuch ausgelösten Cholesterolausfällungen nehmen ihren ausgeprägtesten Verlauf bei pH-Werten zwischen 5 und 7. Die Testsubstanz alleine ist in der Lage, ein Absinken der ursprünglichen Extinktion auf 18% zu bewirken. Die in Nummer 4,5,8 und 9 zugegebenen Immunkomplexe verstärken die intermolekularen plasmadestabilisierenden Anziehungskräfte, so dass ihr deutlicher Einfluss dokumentiert werden kann. Noch weiteres Senken des pH-Wertes führt eher zu einer Hemmung der bis dahin festgestellten Phänomene.

#### **4.6 Versuchsaufbau zur Resuspension bereits präzipitierter Immunkomplex-Lipoproteinvesikel**

In diesem Teil der Dissertation soll ein System etabliert werden, welches dazu dient, Substanzen ausfindig zu machen, die in der Lage sind, bereits abgelaufene Präzipitationsvorgänge wieder rückgängig zu machen.

Die in den bisher ausgeführten Modellversuchen untersuchten Substanzen lassen sich nach ihren Einwirkungen auf die Plasmastabilität –insbesondere nach der Geschwindigkeit, mit der sich die Konglomerate bilden, in drei verschiedene Klassen einteilen: es gibt „Präzipitersubstanzen“ die zu schneller, mittlerer und langsamer Präzipitation- und damit zum Absinken der Extinktion im Überstand der Ansätze führen. Wir haben aus diesen Klassen jeweils einen Vertreter ausgewählt und mit ihm das neue Versuchssystem aufgebaut:

Wie auch schon in den herkömmlichen Versuchen wird ein in-vitro-Modell des Blutserums mit den Präzipitersubstanzen versehen, diesmal jedoch keine Messungen durchgeführt, sondern abgewartet, bis sich die Immunkomplex-Lipoproteinvesikel am Boden der Ansatzgefäße abgesetzt haben und laut den Messergebnislisten keine Extinktionsänderung mehr zu erwarten ist. Jetzt konnten erneut Testsubstanzen in die Reagenzbehälter zugegeben werden und Messdaten erhoben werden.

Ziel war es, die Ablagerung von IC und die mit ihnen zu einem Aggregat verwobenen Lipoproteinvesikel durch Beeinflussung der physikalisch-chemischen Bedingungen wieder aufzulösen und ihre Resolvation in das Serum zu erreichen. Um vergleichbare Werte zu erhalten wurde jeweils ein Versuchsansatz mit und einer ohne Immunkomplexzugabe durchgeführt. Zusätzlich wurden manche Behältern kinetische Energie in Form von Schüttelbewegungen zugeführt, sollten die Resolutionskräfte zu gering sein um ein bestehendes Präzipitat wieder aufzulösen.

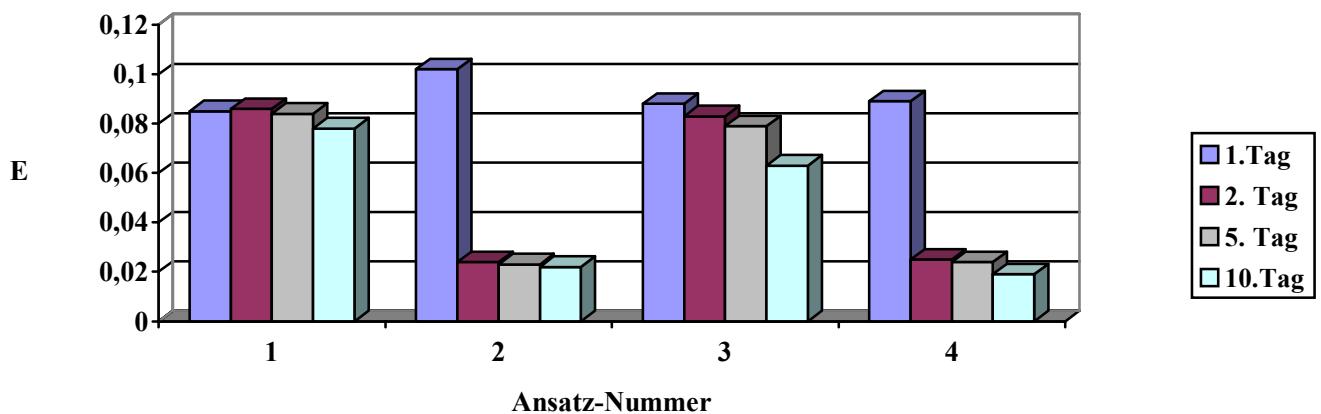
Alle folgenden Versuch entsprechen dem Versuchstyp 3, das zugehörige Pipettierschema und die Konzentrationen der beteiligten Stoffe können auch hier aufgrund der besseren Übersichtlichkeit dem Kapitel 3.8.1 entnommen werden.

**4.6.1 Versuche mit der zur mittleren Geschwindigkeitsklasse gehörigen Präzipitier-  
substanz Poly-L-Arginin-hydrochlorid mit einem Molekulargewicht zwischen 70  
000 und 100 000 Dalton und einem pH-Optimum von 5  
(Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 3892)**

Arginin ist eine hydrophile und positiv geladene Aminosäure, deren isoelektrischer Punkt bei pH 11,5 liegt. In diesem pH-Bereich reagiert das Molekül aufgrund seiner Seitenkette basisch. Die Bezugswerte für die folgenden Experimente sind die kurz nach Herstellung des Ansatzes gemessenen Extinktionswerte, welche in der Tabelle grau unterlegt sind.

Ohne IC	pH7	pH 5	Mit IC	pH7	pH 5
Ansatz	1	2	Ansatz	1	2
<b>1. Tag</b>	0,085	<b>0,102</b>	<b>1. Tag</b>	0,088	<b>0,089</b>
<b>2. Tag</b>	0,086	0,024	<b>2. Tag</b>	0,083	0,025
<b>5. Tag</b>	0,084	0,023	<b>5. Tag</b>	0,079	0,024
<b>10. Tag</b>	0,078	0,022	<b>10. Tg</b>	0,063	0,019

**Tabelle 37:** Messergebnisse von Poly-L-Arginin

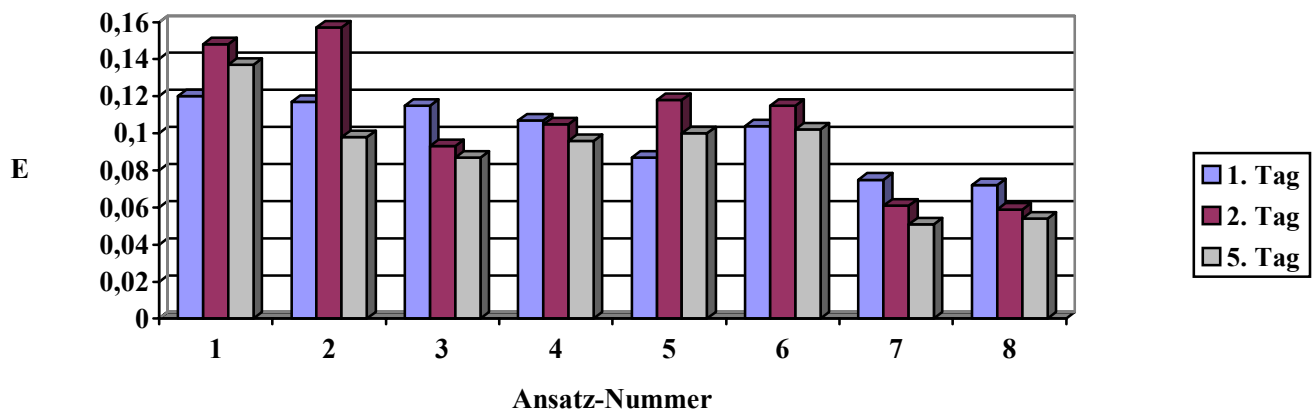


**Abbildung 31:** Extinktionsverlauf von L-Arginin mit und ohne Immunkomplexeinwirkung

**4.6.1.1 Versuch 25: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Ornithin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4538)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glutamin		ohne Glutamin		mit Glutamin		ohne Glutamin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,120	0,117	0,115	0,107	0,087	0,104	0,075	0,072
5.Tag	0,148	0,157	0,093	0,105	0,118	0,115	0,061	0,059
10.Tag	0,137	0,098	0,087	0,096	0,100	0,102	0,051	0,054

**Tabelle 38:** Messergebnisse des Resuspensionsversuches mit Poly-L-Ornithin



**Abbildung 32:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin

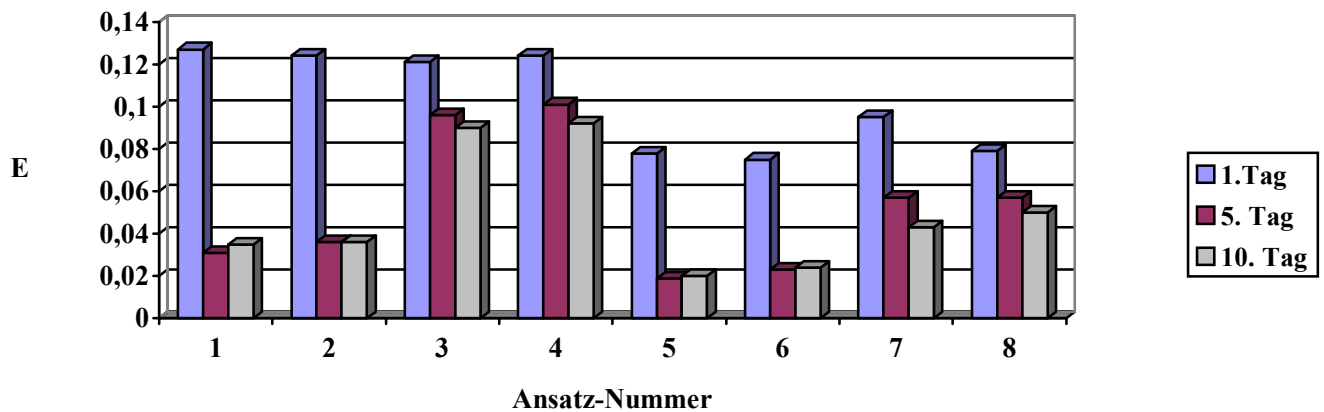
In allen Abschnitten des Versuches kommt es zu weiterem Absinken der Extinktion. Der Zusatz der Testsubstanz führt zunächst zu einem Wiederanstieg der Eigenextinktion des eigentlich präzipitierten Vorversuches. Versuch Nr. 1 und 2 zeigt zwar einen leichten Zwischenanstieg am fünften Tag, der jedoch anschließend in allen Ansätzen bis auf zweimal (Nr.1 und 6) -unter seinen Startwert abfällt. In dieser Versuchskonstellation können Resuspensionsvorgänge temporären Verlaufes festgestellt werden, deren größte Intensität unter dem isolierten Einfluss von Ornithin und Zufuhr kinetischer Energie erreicht wird. Der maximalste Extinktionswert der Hauptsubstanz Poly-L-Arginin wird dabei um bis zu 35% überschritten, was auf einen intensivierten Angriff des Polymeres auf die im Kernbereich reich cholesterolhaltigen Lipoproteinvesikel schließen lässt.

**4.6.1.2 Versuch 26: Resuspensionspartner: Das ungeladene, polare Polypeptid Poly-L-Asparagin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 8137)**

Der isoelektrische Punkt von Asparagin liegt bei pH 2,77. Die AS besitzt eine Amid-Seitenkette

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Asparagin		ohne Asparagin		mit Asparagin		ohne Asparagin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
	vor Zug.	0,127	0,124	0,121	0,124	0,078	0,075	0,095
5.Tag	0,031	0,036	0,096	0,101	0,019	0,023	0,057	0,057
10.Tag	0,035	0,036	0,090	0,092	0,020	0,024	0,043	0,050

**Tabelle 39:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Asparagin



**Abbildung 33:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparagin

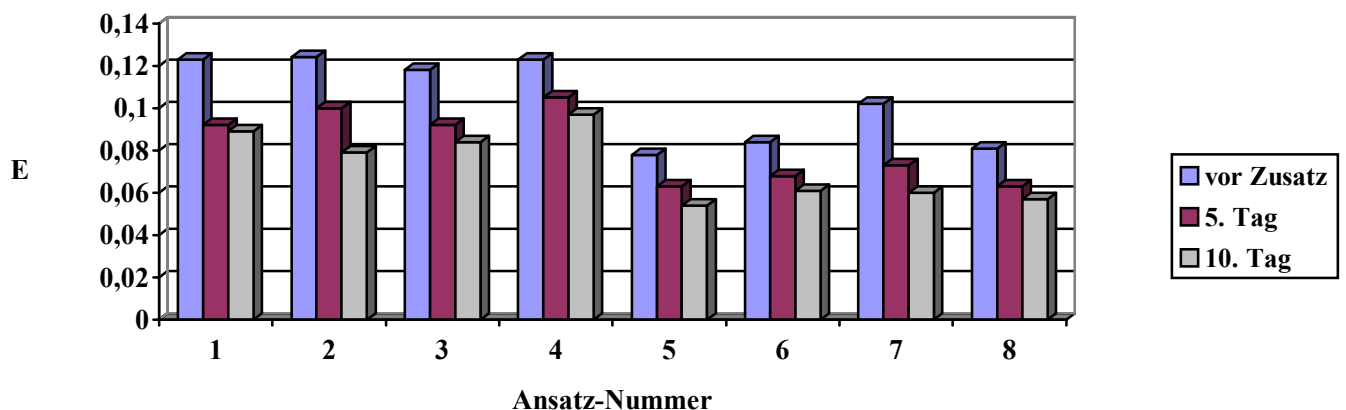
Wie schon im Versuch zuvor, kommt es hier lediglich zu einem weiteren Abfall der Extinktionsrate und zu keinen Resuspensionsvorgängen. Durch Zusatz des Resuspensionspartners kommt es zum sofortigen Wiederanstieg der Extinktion. Allerdings kann auch an diesem Beispiel deutlich gemacht werden, dass die Anwesenheit von IC den Trend unterstützt, zu einer verstärkten Präzipitation zu führen.

#### 4.6.1.3 Versuch 27: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Hydroxy-Prolin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 20000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 0388)

Enthält als einzige aller 20 in Proteinen vorkommenden Aminosäuren eine sekundäre, zyklische Aminogruppe. Diese bewirkt, dass an den Prolin-Positionen eines Proteins helikale Strukturen unterbrochen werden( sog. Helix-Unterbrecher). Der isoelektrische Punkt dieser AS liegt bei pH 6,64.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Prolin		ohne Prolin		mit Prolin		ohne Prolin	
	Ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,123	0,124	0,118	0,123	0,078	0,084	0,102	0,081
5.Tag	0,092	0,100	0,092	0,105	0,063	0,068	0,073	0,063
10.Tag	0,089	0,079	0,084	0,097	0,054	0,061	0,060	0,057

**Tabelle 40:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Prolin



**Abbildung 34:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Prolin

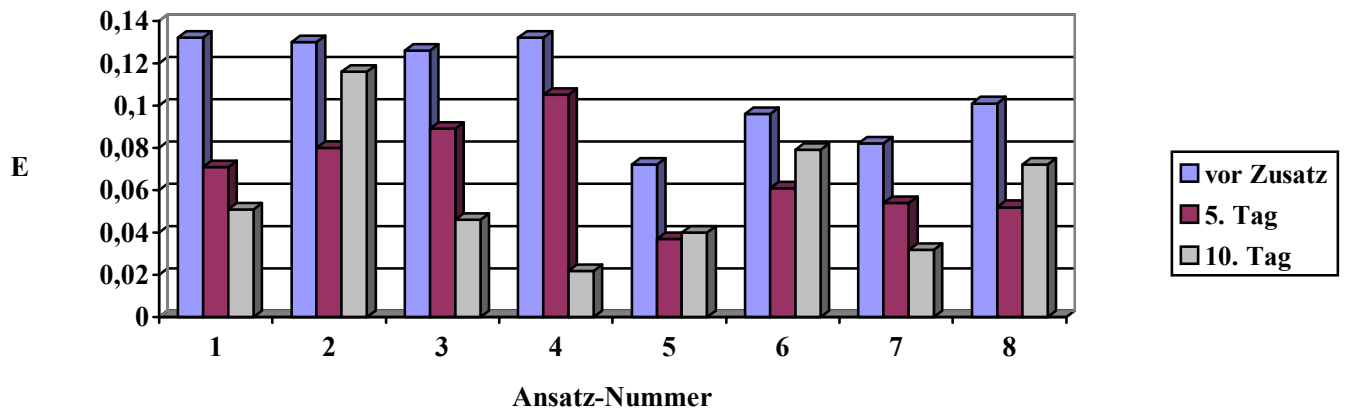
Die Messwerte, die bei Zusatz der Aminosäure erhoben wurden, geben keinen Anhaltspunkt für eine Resuspension. In allen Versuchsansätzen kommt es zu einer weiteren Verstärkung der Extinktionsabnahme, in keinem zu einem Wiederanstieg, der Rückschlüsse auf Wiederaanreicherung von Cholesterol im Überstand der Eppendorf-Behälter zulassen würde.

#### 4.6.1.4 Versuch 28: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-DL-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 9003)

Alanin ist bei pH 6,0 (IP) eine unpolare und hydrophobe Aminosäure.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Alanin		ohne Alanin		mit Alanin		ohne Alanin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,132	0,130	0,126	0,132	0,072	0,096	0,082	0,101
5.Tag	0,071	0,080	0,089	0,105	0,037	0,061	0,054	0,052
10.Tag	0,051	0,116	0,046	0,022	0,040	0,079	0,032	0,072

**Tabelle 41:** Messergebnisse des Resuspensionsversuches mit Poly-DL-Alanin



**Abbildung 35:** Extinktionsverlauf von Poly-DL-Alanin

In dieser Anordnung kommt es zu einer sehr schwach ausgeprägten Resuspensionserscheinungen. Ansatz Nr. 2 zeigt einen Wiederanstieg am zehnten Tag der Messreihe, ähnliche Bilder können auch in Versuch Nr. 6 und 8 festgestellt werden.

In allen anderen verstärkt der Zusatz von Testsubstanz oder IC eher die weitere Abnahme der Cholesterinfraktion aus dem Überstand.

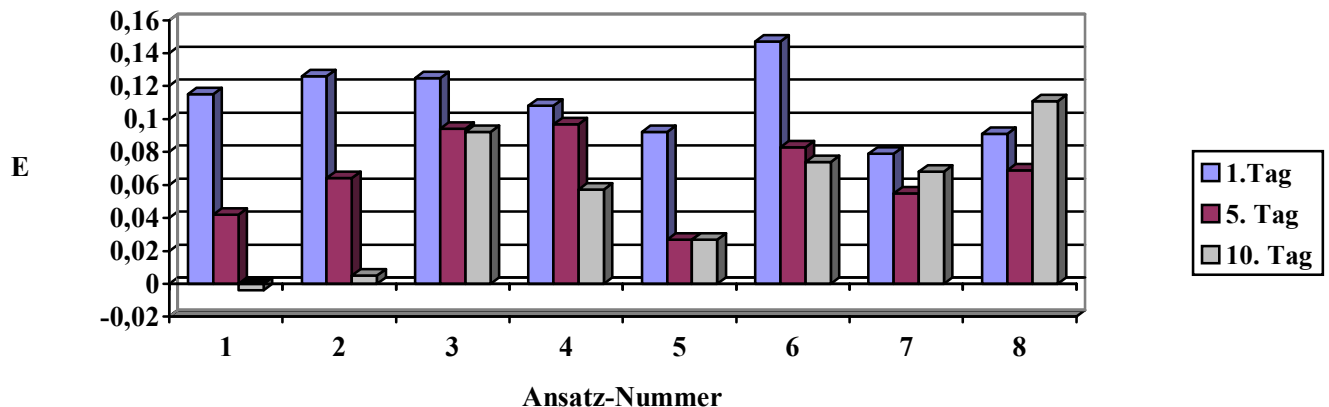


#### 4.6.1.5 Versuch 29: Resuspensionspartner: Das unpolare, hydrophobe und optisch inaktive Polypeptid Poly-L-Glycin mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr.P8791)

Der isoelektrischer Punkt dieser AS liegt bei pH 5.97.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glycin		ohne Glycin		mit Glycin		ohne Glycin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,115	0,126	0,125	0,108	0,092	0,147	0,079	0,091
5.Tag	0,042	0,064	0,094	0,097	0,027	0,083	0,055	0,069
10.Tag	-0,004	0,005	0,092	0,057	0,027	0,074	0,068	0,111

**Tabelle 42:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glycin



**Abbildung 36:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Glycin

Während es durch das Einwirken von Glycin allein zu einer massiven Verstärkung der Extinktionsminderung bis in negative Zahlenbereiche kommt (Versuch Nr.1 und 2), können durch Zugabe von Immunkomplexen in Nr. 7 und 8 Wiederauflösungsprozesse beobachtet werden. Am zehnten Tag kommt es zum Anstieg der Cholesterinfraktion im Überstand, in Versuch Nr.8, der durch Schütteln noch zusätzlich aktiviert wurde, kommt es sogar zum Anstieg über den Ausgangswert hinaus.

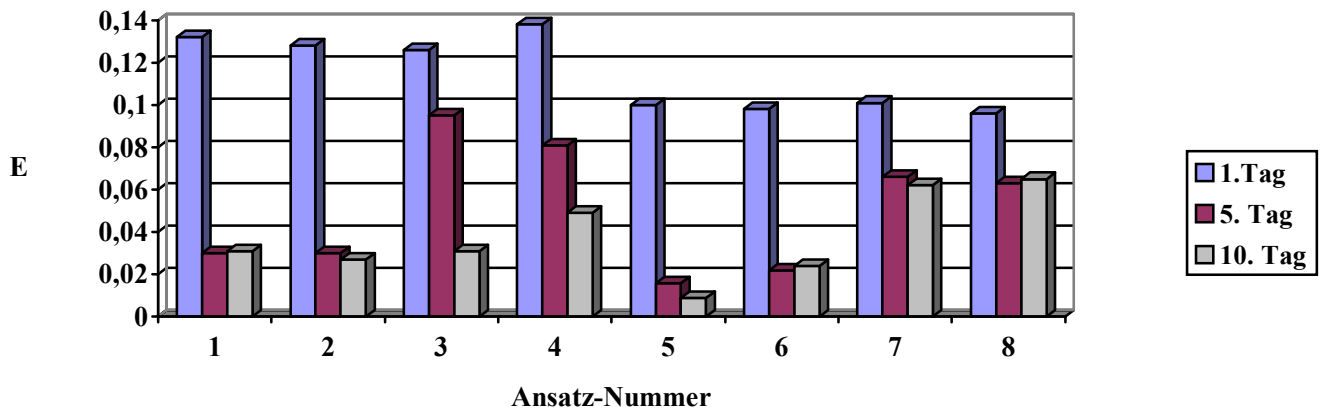
Glycin ist bei diesem Versuch nicht in der Lage, konglomerierte Präzipitate vom Boden der Versuchsbehälter wieder in Lösung zu bringen, die mit stark polaren Gruppen versehenen Immunkomplexe vermögen eine teilweise Herauslösung zu erreichen.

#### 4.6.1.6 Versuch 30: Resuspensionspartner: Das negativ geladene, saure Polypeptid Poly-DL-Aspartat mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 10000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr.P 3418)

Der isoelektrische Punkt dieser AS liegt bei pH 2,77.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Aspartatsr.		ohne Aspartatsr.		mit Aspartatsr.		ohne Aspartatsr.	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,132	0,128	0,126	0,138	0,100	0,098	0,101	0,096
5.Tag	0,030	0,030	0,095	0,081	0,016	0,022	0,066	0,063
10.Tag	0,031	0,027	0,031	0,049	0,009	0,024	0,062	0,065

**Tabelle 43:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit DL-Aspartat



**Abbildung 37:** Extinktionsverlauf von Poly-DL-Aspartat

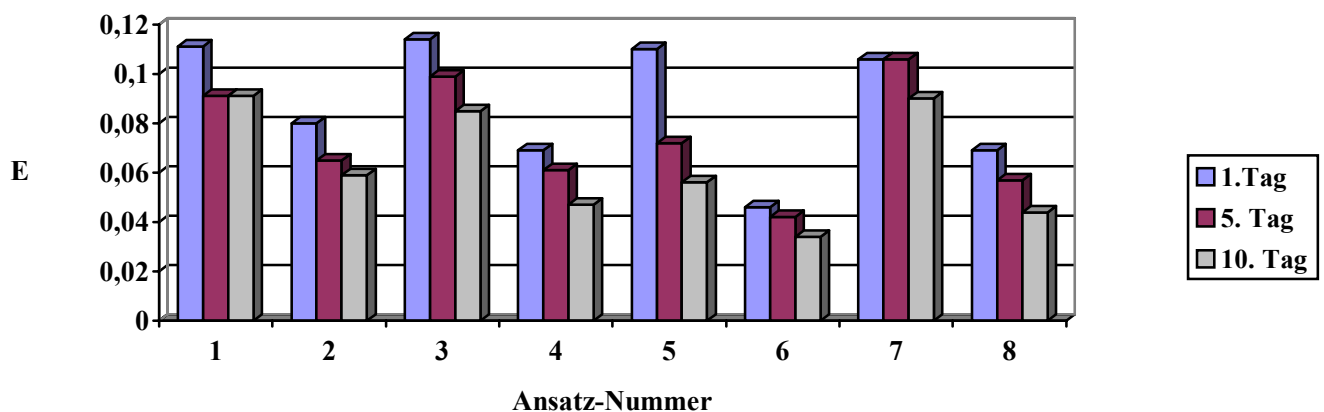
Aspartat bewirkt zunächst einen massiven Wiederanstieg der Extinktion in allen durchgeführten Experimenten. Am fünften Tag der Messreihe sinkt die Cholesterinfraktion auf jeweils 23% in Ansatz Nr. 1 und 6 -was dem Zusatz von Aspartat alleine und der kombinierten Zugabe von Aspartat und IC entspricht. Ansatz Nr. 2 und 5 zeigen ihre ausgeprägteste Schwächung der Extinktion am letzten Tag der Messung. Die Zugabe von AS wurde in Nr.2 geschüttelt und führt zu einem Wert von 21% Extinktionsabnahme, in Nr.5 bewirken IC und der Resuspensionspartner eine Abnahme auf 9% des Eingangswertes.

#### 4.6.1.7 Versuch 31: Resuspensionspartner: Das hydrophob-unpolare Polypeptid Poly-L-Tryptophan mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr.P 4647)

Diese Aminosäure besitzt eine aromatische Seitenkette, ihr isoelektrischer Punkt liegt bei pH 5,89.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Tryptophan		ohne Tryptophan		mit Tryptophan		ohne Tryptophan	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,111	0,080	0,114	0,069	0,110	0,046	0,106	0,069
5.Tag	0,091	0,065	0,099	0,061	0,072	0,042	0,106	0,057
10.Tag	0,091	0,059	0,085	0,047	0,056	0,034	0,090	0,044

**Tabelle 44:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Tryptophan



**Abbildung 38:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Tryptophan

Auch der Zusatz dieser essentiellen AS führt zu keinem Resuspensionseffekt. Nach dem Wiederanstieg der Extinktion als Auswirkung der Partnersubstanzzugabe fallen die Cholesterolfractionen in allen Ansätzen bis zum zehnten Tag um bis zu 51% in Nr. 5 ab. Trotzdem lässt sich die verstärkende Komponente von Iummkomplexanwesenheit auf das Präzipitationsverhalten dokumentieren.

#### 4.6.2 Versuche mit der zur langsamen Geschwindigkeitsklasse gehörigen sauren, negativ geladenen Präzipitiersubstanz Poly-L-Asparagin mit einem pH-Optimum von 5 (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 8137)

Die Bezugswerte für die folgenden Experimente sind die kurz nach Herstellung des Ansatzes gemessenen Extinktionswerte, welche in der Tabelle grau unterlegt sind.

Ohne IC	pH7	pH 5	Mit IC	pH7	pH 5
Ansatz	1	2	Ansatz	3	4
1. Tag	0,124	0,127	1. Tag	0,131	0,118
2. Tag	0,114	0,114	2. Tag	0,111	0,103
5. Tag	0,112	0,110	5. Tag	0,108	0,103
10. Tag	0,110	0,098	10. Tag	0,112	0,057

Tabelle 45: Messergebnisse von Poly-L-Asparagin

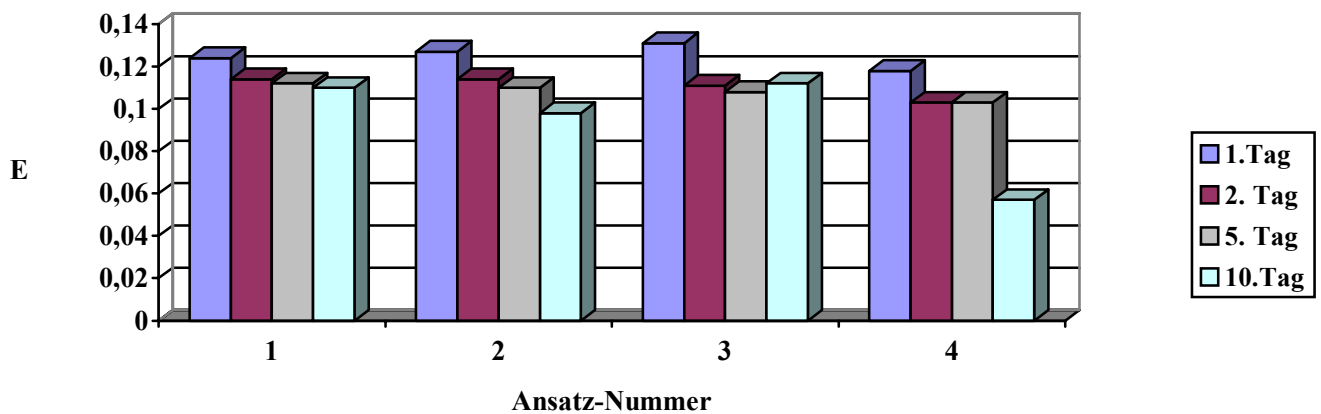


Abbildung 39: Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparagin mit und ohne Immunkomplexeinwirkung

#### 4.6.2.1 Versuch 32: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Ornithin Hydrobromid mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P4538)

Ornithin, eine Diaminoverlensäure, kommt als Zwischenprodukt bei der Harnstoffbildung im Harnstoffzyklus vor.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Ornithin		ohne Ornithin		mit Ornithin		ohne Ornithin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,144	0,129	0,144	0,127	0,121	0,097	0,120	0,105
5.Tag	0,044	0,041	0,118	0,005	0,039	-0,009	0,045	0,089
10.Tag	0,041	0,038	0,099	0,002	0,027	0,000	0,038	0,069

Tabelle 46: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Ornithin

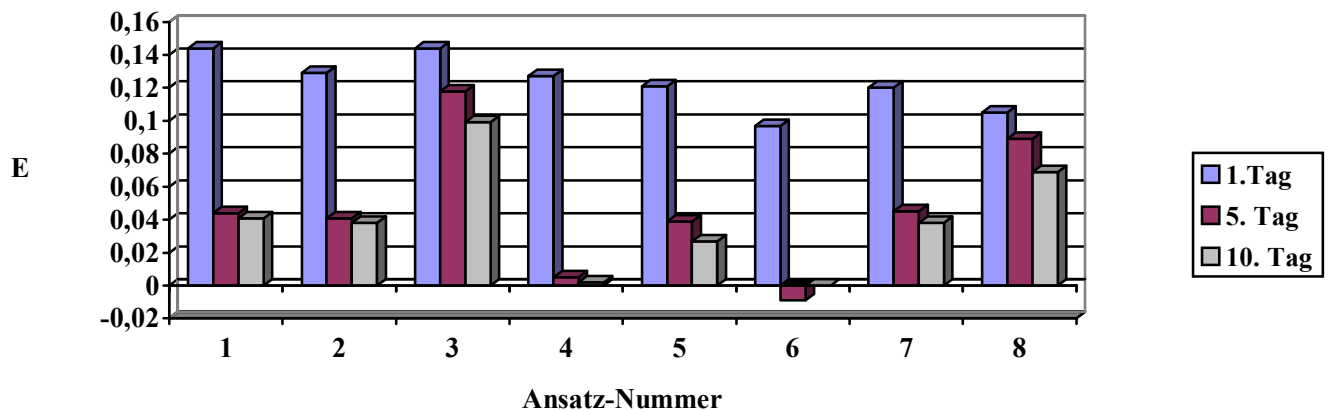


Abbildung 40: Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin

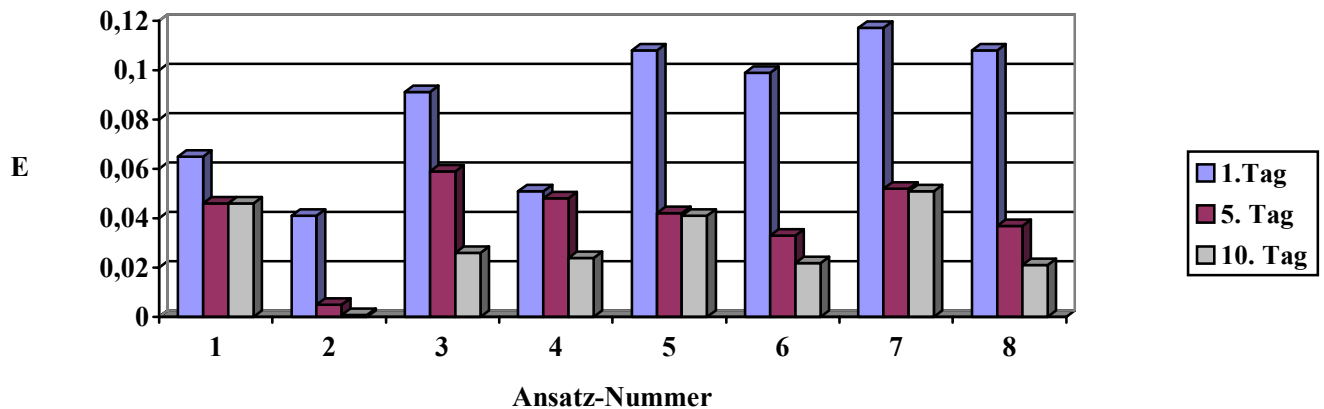
Die Aminosäure löst nach einem initialen Anstieg der Extinktion ein Absinken des Cholesterolgehaltes im Überstand der Eppendorfbehälter aus. Die zusätzliche Anwesenheit von Immunkomplexen verstärkt diese Phänomen (Ansatz Nr. 4 und 5). Dabei kommt es zur Abschwächung der Extinktion auf 22% in Nr.4, bzw. zum völligen Verschwinden von Cholesterol aus dem Überstand (Nr.5). Zu Resuspensionseffekten kommt es in diesem Experiment nicht.

#### 4.6.2.2 Versuch 33: Resuspensionspartner: Das saure, negativ geladene Polypeptid Poly-L-Asparagin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 8137)

Der isoelektrische Punkt dieser Aminosäure liegt bei pH 2,77.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Asparagin		ohne Asparagin		mit Asparagin		ohne Asparagin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,065	0,041	0,091	0,051	0,108	0,099	0,117	0,108
5.Tag	0,046	0,005	0,059	0,048	0,042	0,033	0,052	0,037
10.Tag	0,046	0,001	0,026	0,024	0,041	0,022	0,051	0,021

**Tabelle 47:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Asparagin



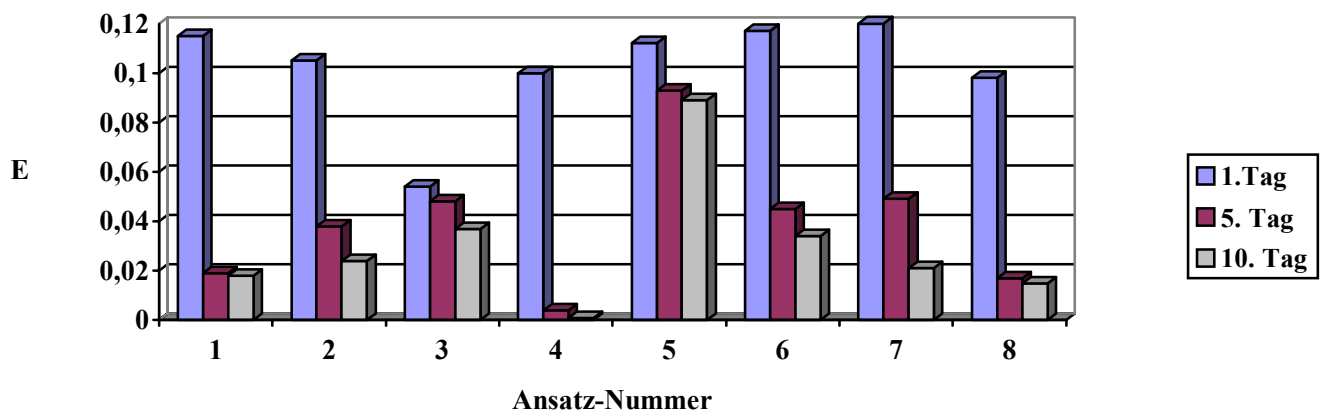
**Abbildung 41:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparagin

Asparagin führt, wie auch schon in früher durchgeführten Versuchen, zu keinen Resuspensionseffekten. Nach dem kurz nach Zugabe der Substanz feststellbaren Anstieg der Extinktion wird diese im Verlauf von 5, bzw. 10 Tagen mit unterschiedlicher Intensität wieder abgeschwächt. Der letzte gemessene Wert liegt dabei immer niedriger als der am ersten Tag bestimmte. Auch das Vorhandensein von Immunkomplexen hat keinen zusätzlichen Effekt auf die Geschwindigkeit oder das Ausmaß der erneuten Konglomeratentstehung.

**4.6.2.3 Versuch 34: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-Hydroxy-Prolin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 20000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 0388)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Hydroxypro		ohne Hydroxypro		mit Hydroxypro		ohne Hydroxypro	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,115	0,105	0,054	0,100	0,112	0,117	0,120	0,098
5.Tag	0,019	0,038	0,048	0,004	0,093	0,045	0,049	0,017
10.Tag	0,018	0,024	0,037	0,001	0,089	0,034	0,021	0,015

**Tabelle 48:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Hydroxy-Prolin



**Abbildung 42:** Extinktionsverlauf von Hydroxy-Prolin

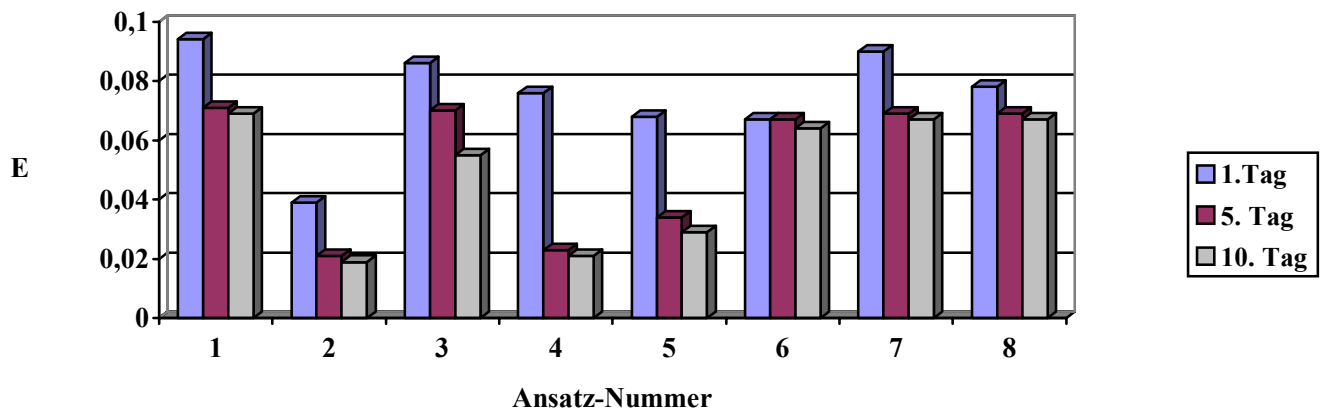
Weder Prolin noch Immunkomplexe lösen nach Zugabe zum präzipitierten Versuchsaufbau eine Resuspension aus. Im Vergleich zu den Kurvenverläufen in Versuch 27 fallen die hier festgestellten Werte weitaus unregelmäßiger aus. Dennoch bewirkt Prolin, in einem Modellsystem, das zuvor mit Asparagin reagiert hat, eine weitere Abnahme der Extinktion, in Kombination mit IC wird die Konglomeratbildung etwas abgeschwächt: 23% in Ansatz Nr.2 stehen 30% Abnahme in Ansatz Nr. 6 gegenüber.

#### 4.6.2.4 Versuch 35: Resuspensionsparnter: Das hydrophobe, ungeladene Polypeptid Poly-D,L-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 9003)

Der isoelektrische Punkt dieser Aminosäure liegt bei pH 6,00.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Alanin		ohne Alanin		mit Alanin		ohne Alanin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,094	0,039	0,086	0,076	0,068	0,067	0,090	0,078
5.Tag	0,071	0,021	0,070	0,023	0,034	0,067	0,069	0,069
10.Tag	0,069	0,019	0,055	0,021	0,029	0,064	0,067	0,067

**Tabelle 49:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-DL-Alanin



**Abbildung 43:** Extinktionsverlauf von Poly-DL-Alanin

Das Polypeptid Alanin allein vermag die Eingangsextinktion auf 73% in Ansatz Nr.1 und auf 49% in Ansatz Nr.2 zu vermindern. Zuvor kommt es nach Zugabe in die Versuchsbehälter in allen Ansätzen zu einem Anstieg des Extinktionswertes. Genauso nimmt der Cholesterolgehalt im Überstand ohne Ausnahme wieder ab. Auflösungsprozesse der Lipoprotein-Immunkomplexkonglomerate, die mit einem späteren Anstieg der Extinktion einhergehen würden, können nicht dokumentiert werden.



#### 4.6.2.5 Versuch 36: Resuspensionspartner: das hydrophobe, unpolare und optisch inaktive Polypeptid Poly-L-Glycin mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 8791)

Der isoelektrische Punkt dieser Aminosäure liegt bei pH 5,9

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glycin		ohne Glycin		mit Glycin		ohne Glycin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,086	0,071	0,075	0,077	0,091	0,048	0,093	0,067
5.Tag	0,042	0,011	0,016	0,036	0,064	0,061	0,119	0,027
10.Tag	0,031	0,009	0,009	0,029	0,055	0,049	0,120	0,015

Tabelle 50: Messergebnisse des Resuspensionsversuches mit Poly-L-Glycin

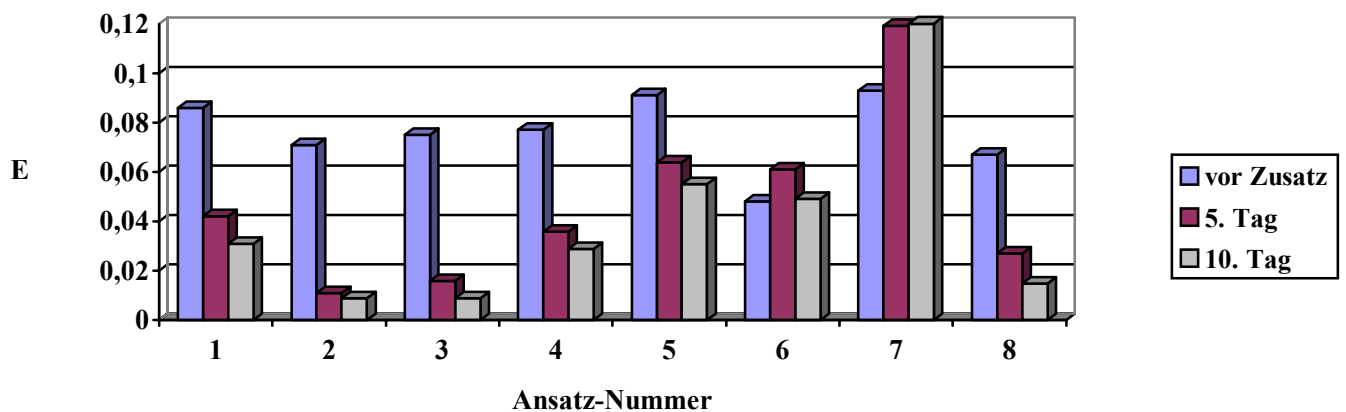


Abbildung 44: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glycin

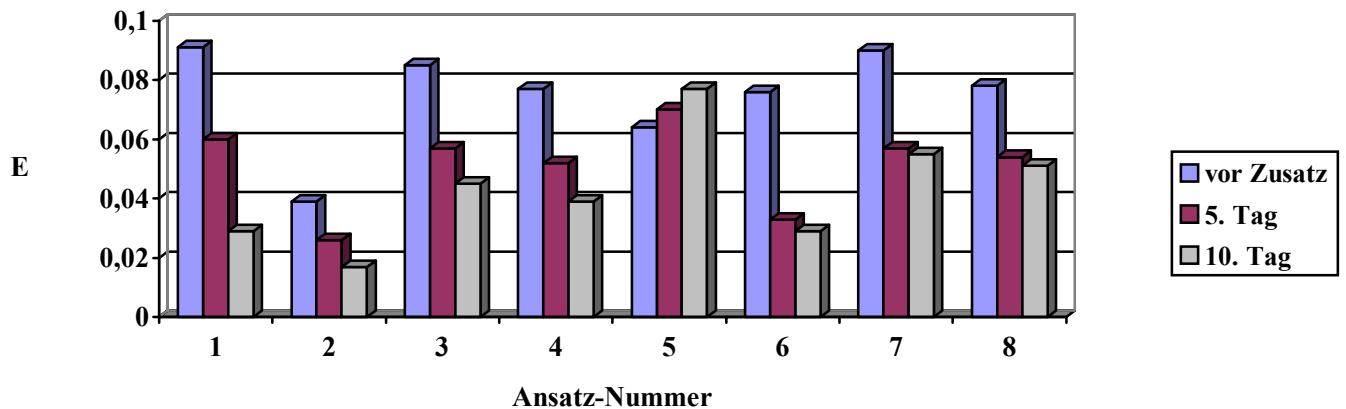
In Ansatz Nr. 6 kommt es zu einem minimalen Wiederanstieg des Extinktionswertes auf 52% am fünften Tag. Ansatz-Nr. 7 zeigt die isolierte Einwirkung von Immunkomplexen. Hier zeigt sich ebenfalls eine dauerhafte Resuspensionstendenz, der aber aufgrund des Fehlens der Aminosäure nur Kontrollcharakter zugesprochen werden kann. In allen anderen Experimenten kommt es zunächst zum Wiederanstieg der Eingangsextinktion, die sich bis zum zehnten Tag jedoch bis auf die zwei Ausnahmen wieder in sehr niedrige Bereiche absenken.

#### 4.6.2.6 Versuch 37: Resuspensionspartner: Das negativ geladene Polypeptid Poly-( $\alpha,\beta$ )-DL-Asparaginsäure (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 3418)

Die Aminosäure hat einen isoelektrischen Punkt von pH 2,77

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Asparaginsr		ohne Asparaginsr		mit Asparaginsr		ohne Asparaginsr	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,091	0,039	0,085	0,077	0,064	0,076	0,090	0,078
5.Tag	0,060	0,026	0,057	0,052	0,070	0,033	0,057	0,054
10.Tag	0,029	0,017	0,045	0,039	0,077	0,029	0,055	0,051

**Tabelle 51:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Asparaginsäure



**Abbildung 45:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparaginsäure

In Ansatz Nr.5 kommt es zu einem Extinktionsanstieg, der sich über die gesamten zehn Tage bis auf 65% des Eingangswertes annähert. Alle anderen Versuchsansätze zeigen abfallende Extinktionswerte, Resuspensionsvorgänge können deshalb nicht dokumentiert werden.

#### 4.6.2.7 Versuch 38: Resuspensionspartner: Das unpolare-hydrophobe Polypeptid Poly-Tryptophan mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4647)

Die Aminosäure, welche eine aromatische Seitenkette besitzt, hat einen isoelektrischen Punkt bei pH 5,89.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Tryptophan		ohne Tryptophan		mit Tryptophan		ohne Tryptophan	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,082	0,077	0,089	0,083	0,088	0,067	0,075	0,072
5.Tag	0,058	0,042	0,070	0,036	0,066	0,043	0,042	0,071
10.Tag	0,035	0,023	0,059	0,022	0,027	0,039	0,038	0,058

Tabelle 52: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Tryptophan

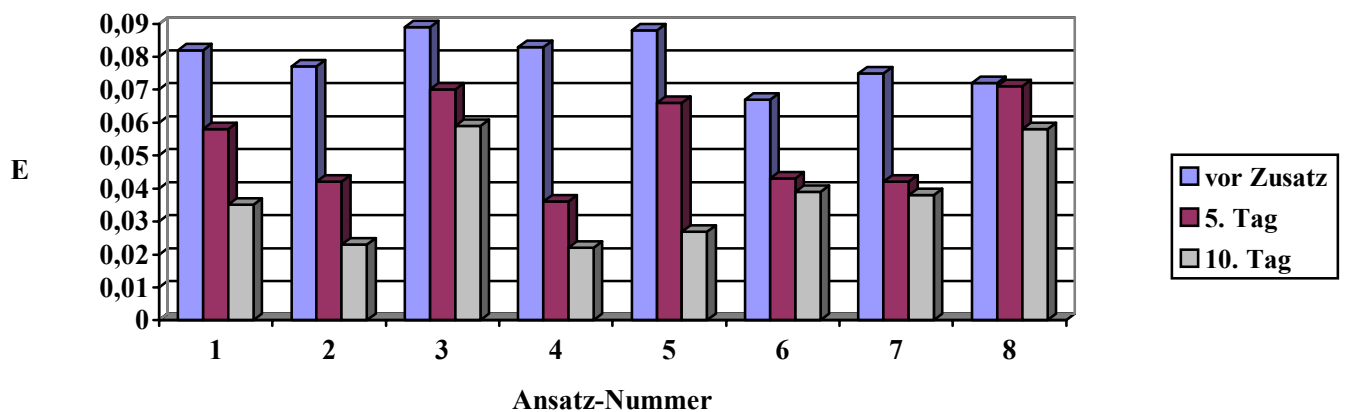


Abbildung 46: Extinktionsverlauf von Poly-L-Tryptophan

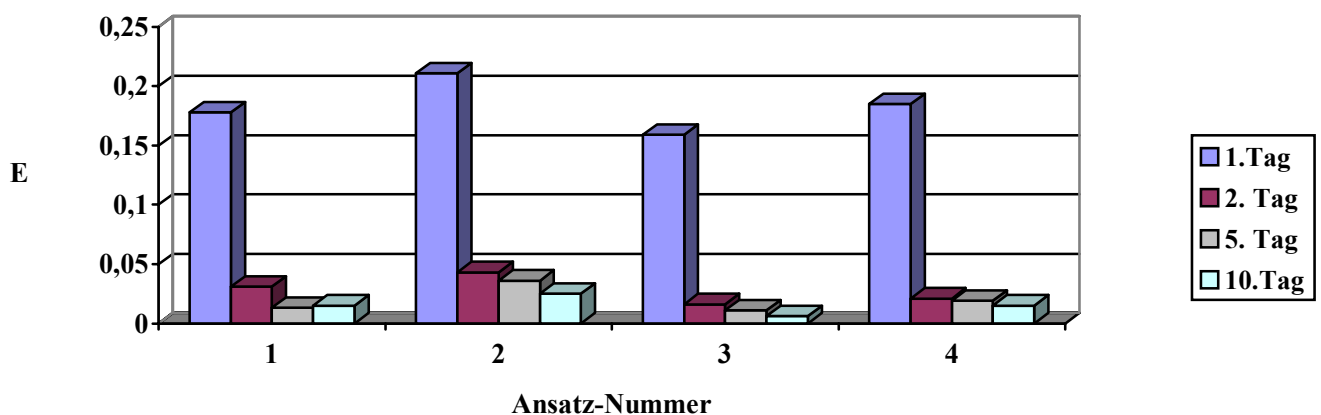
Poly-Tryptophan hebt die in der Versuchsvorbereitung abgefallene Extinktion des Modellserums in allen Messbehältern an und führt im weiteren Verlauf des Experimentes unabhängig von der Anwesenheit von Immunkomplexen, zum Absinken des Cholesterolgehaltes im Überstand der Messgefäße. Es können keine Resuspensionserscheinungen, die mit einem Anstieg der Extinktion verbunden sein müssen, registriert werden.

**4.6.3 Versuche mit der zur schnellen Geschwindigkeitsklasse gehörigen Präzipitier-  
substanz Hauptsubstanz Poly-Arginin-Tyrosin in einem Molekülverhältnis von  
4:1 und einem pH-Optimum von 7  
(Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 7411)**

Die Bezugswerte für die folgenden Experimente sind die kurz nach Herstellung des Ansatzes gemessenen Extinktionswerte, welche in der Tabelle grau unterlegt sind.

Ohne IC	pH7	pH 5	Mit IC	pH7	pH 5
Ansatz	1	2	Ansatz	3	4
1. Tag	0,178	0,211	1. Tag	0,159	0,185
2. Tag	0,031	0,043	2. Tag	0,016	0,021
5. Tag	0,013	0,036	5. Tag	0,011	0,019
10. Tag	0,015	0,025	10. Tag	0,006	0,015

**Tabelle 53:** Messergebnisse von Poly-L-Arginin-Tyrosin 4:1



**Abbildung 47:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Arginin-Tyrosin 4:1 mit und ohne Immunkomplexeinwirkung

Das für diesen Basisversuch verwendete Heteropolymer besteht zu vier Teilen aus dem hydrophilen, basisch und positiv geladenen Arginin und zu einem Teil aus dem ungeladenen, polaren Tyrosin, welches eine aromatische Seitenkette besitzt. Die isoelektrischen Punkte der Aminosäuren liegen bei pH 11,15 (Arginin) und pH 5,66 (Tyrosin).

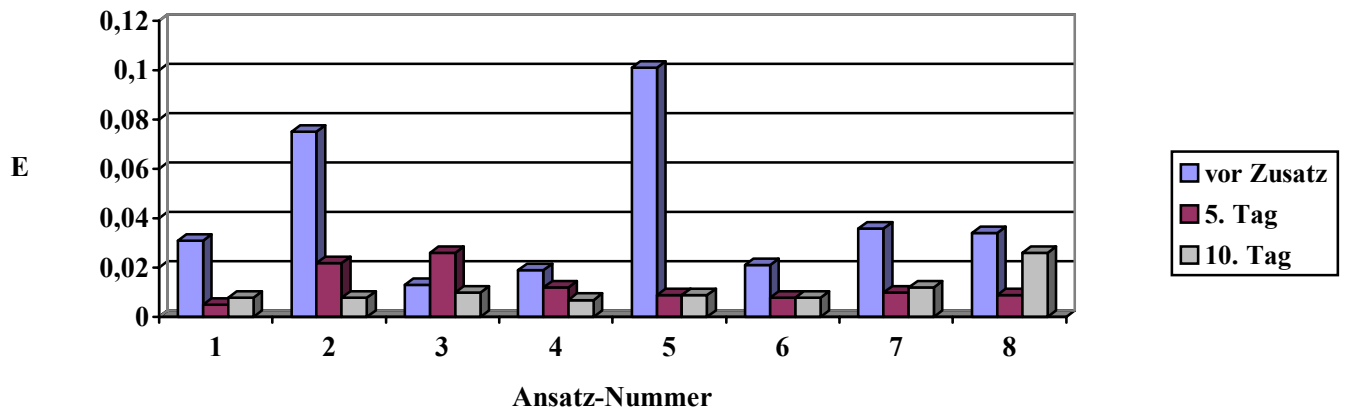
Im oben dargestellten Extinktionsverlauf, kann man deutlich die Zugehörigkeit der Substanz zur schnellen Präzipitationsgruppe (eine interne Einteilung unserer Arbeitsgruppe) erkennen. Schon nach 48 Stunden fällt der Extinktionswert auf 18% in Ansatz-Nr.1, die Anwesenheit von Immunkomplexen verstärkt den Effekt mit einer Abnahme auf 11%.

#### 4.6.3.1 Versuch 39: Resuspensionspartner: Das hydrophobe, unpolare Polypeptid Poly-D,L-Alanin mit einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 9003)

Der isoelektrische Punkt dieser Aminosäure liegt bei pH 6,00.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Alanin		ohne Alanin		mit Alanin		ohne Alanin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,031	0,075	0,013	0,019	0,101	0,021	0,036	0,034
5.Tag	0,005	0,022	0,026	0,012	0,009	0,008	0,010	0,009
10.Tag	0,008	0,008	0,010	0,007	0,009	0,008	0,012	0,026

**Tabelle 54:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-DL-Alanin



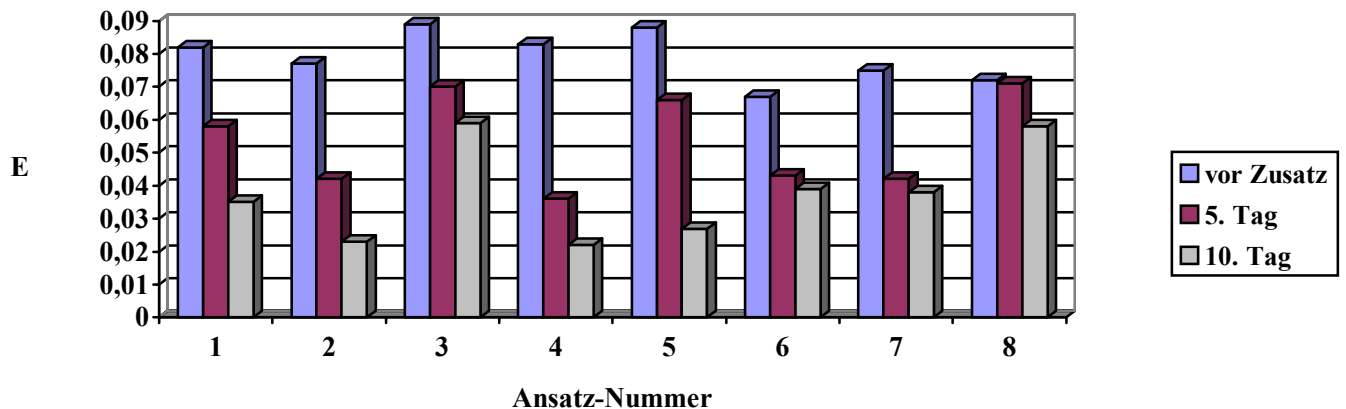
**Abbildung 48:** Extinktionsverlauf von Poly-DL-Alanin

Der Zusatz der Aminosäure bewirkt zunächst unterschiedlich stark ausgeprägte Anstiege der Eingangsextinktion (Versuche Nr.1, 2, 5 und 6). Betrachtet man als nächstes die Versuche, die möglichst erschütterungsfrei gelagert und mit größtmöglicher Vorsicht behandelt wurden, so findet sich in Versuch Nr.1 ein minimaler Wiederanstieg eines Messwertes am 10.Tag auf 6% des ursprünglichen Cholesterolgehaltes im Überstand. In allen anderen Microtubes kommt es zu keinen Veränderungen, die auf einen Resuspensionsvorgang hinweisen könnten.

**4.6.3.2 Versuch 40: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Ornithin mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4538)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Ornithin		ohne Ornithin		mit Ornithin		ohne Ornithin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,082	0,077	0,089	0,083	0,088	0,067	0,075	0,072
5.Tag	0,058	0,042	0,070	0,036	0,066	0,043	0,042	0,071
10.Tag	0,035	0,023	0,059	0,022	0,027	0,039	0,038	0,058

**Tabelle 55:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Ornithin



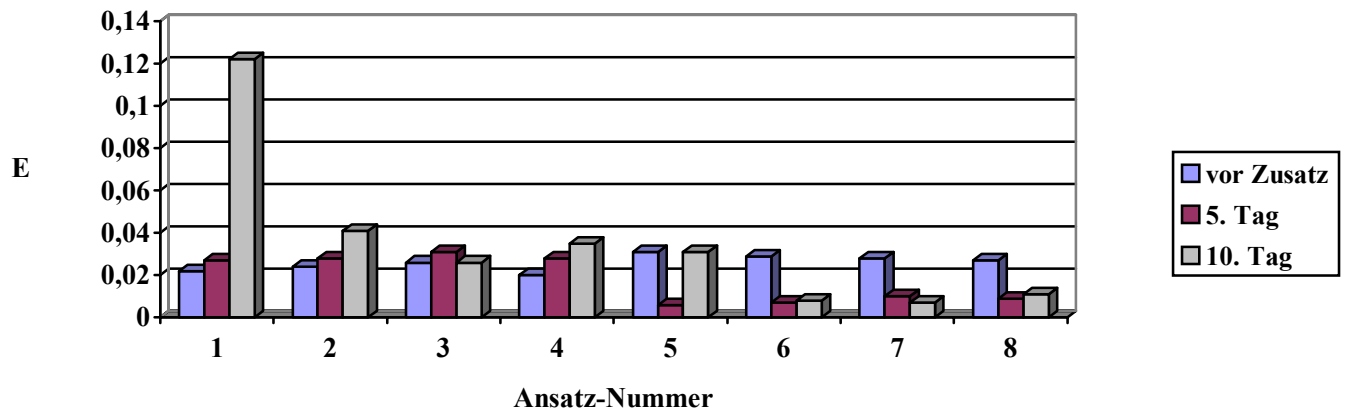
**Abbildung 49:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin

Die Aminosäure Ornithin verursacht einen ausgeprägten Anstieg der im Vorbereitungsversuch abgefallenen Extinction. Im Verlauf der zehn Tage kommt es in allen Überständen wieder zur Cholesterolverarmung. Die Anwesenheit der Substanz führt zu keiner erkennbaren Solubilitätssteigerung des Modellserums weder unter statischen noch unter kinetischen Bedingungen. Auch Imunkomplexe vermögen an der serumdestabilisierenden Wirkung der Substanz nichts verändern.

**4.6.3.3 Versuch 41: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4636)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glutaminsr		ohne Glutaminsr		mit Glutaminsr		ohne Glutaminsr	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,022	0,024	0,026	0,020	0,031	0,029	0,028	0,027
5.Tag	0,027	0,028	0,031	0,028	0,006	0,007	0,010	0,009
10.Tag	0,122	0,041	0,026	0,035	0,031	0,008	0,007	0,011

**Tabelle 56:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin



**Abbildung 50:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin

In Ansatz Nr.1 findet sich eine Wiederanstieg des Cholesterolgehaltes bis auf 69%. Da dieser Effekt in den Ansätzen ohne Glutamingehalt nicht feststellbar ist, kann die Wirkung der Aminosäure zugesprochen werden. Führt man dem System kinetische Energie zu (Ansatz-Nr.2), so fällt das Ergebnis deutlich schwächer aus (Anstieg auf 23%). Immunkomplexe haben keinen zusätzlichen Einfluss auf das Wiederausflösungsverhalten, in Ansatz Nr.5 wird am zehnten Tag der Messreihe wieder der Ausgangswert erreicht.

#### 4.6.3.4 Versuch 42: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-Glutamin-Tyrosin in einem Molekularverhältnis von 1:1 (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 0151)

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glu-Tyr		ohne Glu-Tyr		mit Glu-Tyr		ohne Glu-Tyr	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,019	0,020	0,023	0,021	0,020	0,019	0,022	0,021
5.Tag	0,007	0,008	0,009	0,008	0,006	0,006	0,009	0,009
10.Tag	0,008	0,007	0,011	0,009	0,008	0,008	0,011	0,010

Tabelle 57: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin-Tyrosin

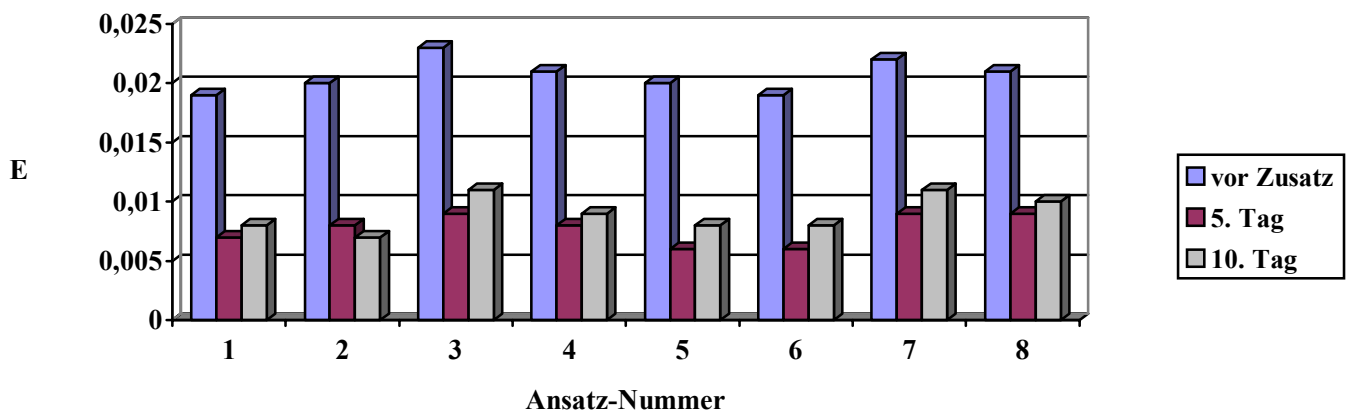


Abbildung 51: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin-Tyrosin

Nach einem initialen Wiederanstieg in allen Microtubes kommt es am fünften Tag der Extinktionsbestimmung zu ihrem Abfall auf bis zu 4% in Versuch Nr.5.

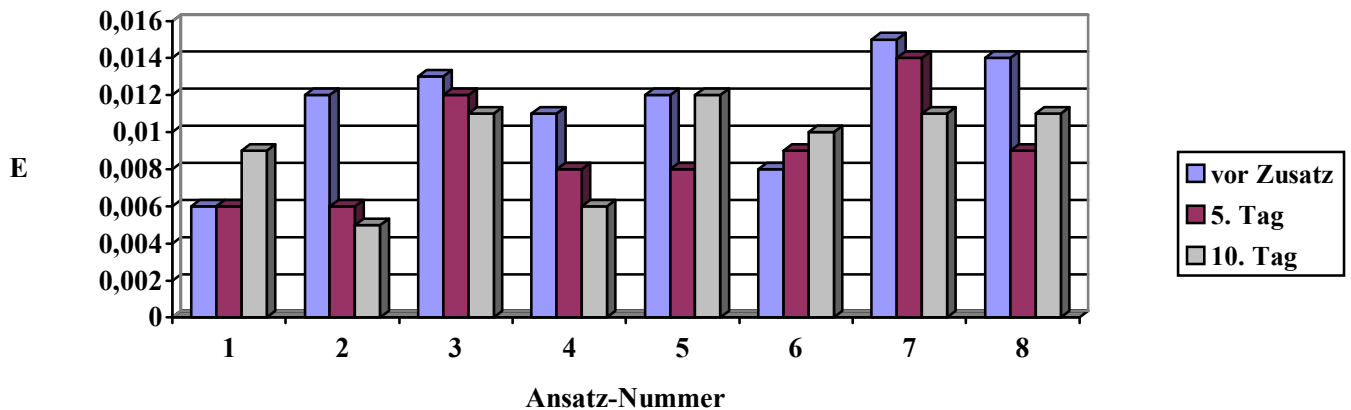
Die am zehnten Tag stattfindenden Cholesterolanreicherungen sind nicht als Resuspensionseffekt verwertbar, da sie auch in den ohne Zusätze angesetzten Kontrollversuchen stattfinden. Das Experiment weist jedoch auf eine präzipitationsverstärkende Wirkung von Immunkomplexen hin, was deutlich wird, wenn man Versuche Nr. 1 und 2 mit Nr.5 und 6 vergleicht. Hier stehen sich Schwächungsraten zwischen 35% und 37% in Nr. 2/1 und zwischen 30% und 32% in Nr. 5 bzw.6 gegenüber.



**4.6.3.5 Versuch 43: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin mit einem Molekulargewicht zwischen 40000 und 60000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1899)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glutamin		ohne Glutamin		mit Glutamin		ohne Glutamin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,006	0,012	0,013	0,011	0,012	0,008	0,015	0,014
5.Tag	0,006	0,006	0,012	0,008	0,008	0,009	0,014	0,009
10.Tag	0,009	0,005	0,011	0,006	0,012	0,010	0,011	0,011

**Tabelle 58:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin



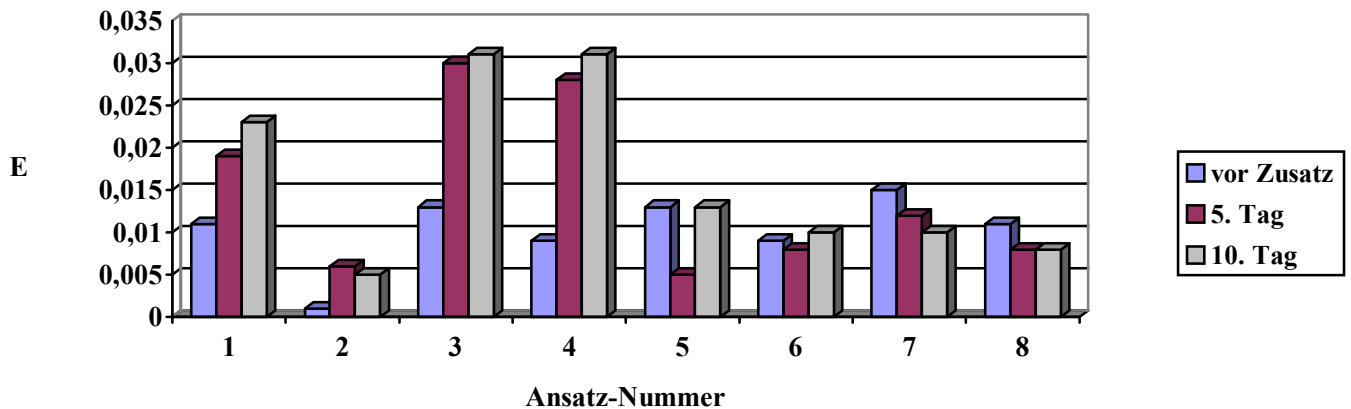
**Abbildung 52:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin

Die bei diesem Versuch interessanten Ansätze tragen die Nummern 1 und 5. Glutamin als isolierter Reaktionspartner ist in der Lage, den ganz zu Beginn festgestellten Cholesterolgehalt des Modellserums auf 6% wieder anzuheben, nachdem er zuvor auf 4% abgefallen war. In Versuch Nr. 5 erreicht die Extinktion wieder ihren Ausgangswert von 8%. Glutamin zeigt hier eine-wenn auch sehr schwach ausgeprägte Tendenz, bereits präzipitiertes Lipoprotein-Immunkomplex-Konglomerate wieder zu resolubilisieren. Diese Annahme wird durch Fehlen der Wiederanstiege in den entsprechenden Kontrollgruppen Nr.3 und Nr.7 bestätigt.

#### 4.6.3.6 Versuch 44: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1943)

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glutaminsr		ohne Glutaminsr		mit Glutaminsr		ohne Glutaminsr	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,011	0,001	0,013	0,009	0,013	0,009	0,015	0,011
5.Tag	0,019	0,006	0,030	0,028	0,005	0,008	0,012	0,008
10.Tag	0,023	0,005	0,031	0,031	0,013	0,010	0,010	0,008

**Tabelle 59:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutaminsäure



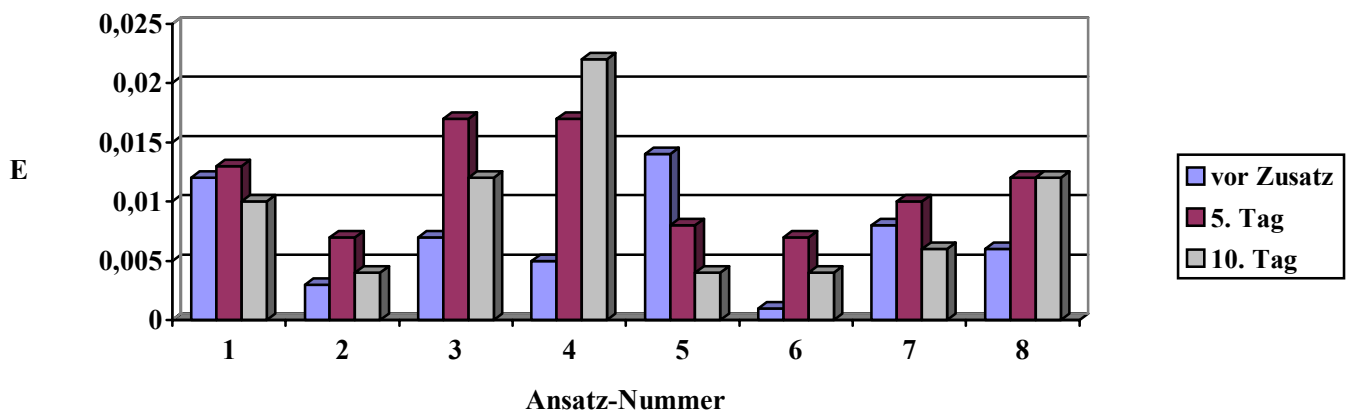
**Abbildung 53:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin

Ansatz Nr.1 zeigt zusammen mit seinem zugehörigen Kontrollversuch Nr.3, einen ausgeprägten Wiederanstieg der Ausgangsextinktion. Da beide Versuche einen identischen Trend wiedergeben, kann nicht auf eine resuspendierende Wirkung der Aminosäure geschlossen werden. Anders verhält es sich in Ansatz-Nr.5: der möglichst schonend behandelte Versuch mit Immunkomplexinhalt zeigt am 10. Tag einen Anstieg auf 8% der Ausgangsextinktion vom 1. Tag. In den restlichen Ansätzen sind keine resolubilisierenden Effekte festzustellen.

**4.6.3.7 Versuch 45: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Lysin succinyliert mit einem Molekülgewicht zwischen 15000 und 30000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4283)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Lysin		ohne Lysin		mit Lysin		ohne Lysin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,012	0,003	0,007	0,005	0,014	0,001	0,008	0,006
5.Tag	0,013	0,007	0,017	0,017	0,008	0,007	0,010	0,012
10.Tag	0,010	0,004	0,012	0,022	0,004	0,004	0,006	0,012

**Tabelle 60:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Lysin



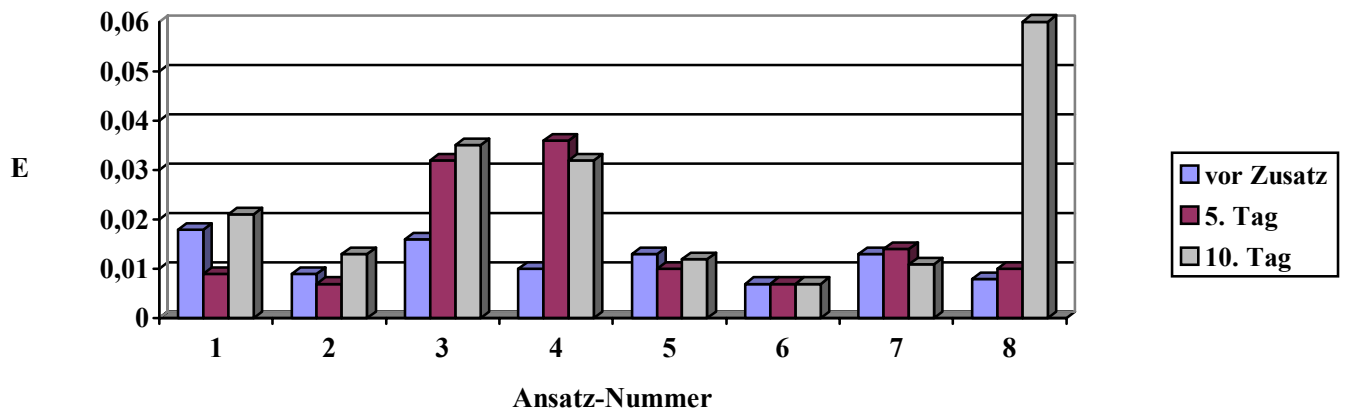
**Abbildung 54:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin

Am 5. Tag der Messreihe verursachen die Aminosäure zusammen mit Immunkomplexen in Ansatz Nr. 6 einen Wiederanstieg des Cholesterolgehaltes im Überstand, welcher durch Einwirkung des Heteropolymers Poly-Arginin-Tyrosin im Vorfeld des Versuches zur Präzipitation und damit zum Absinken gebracht wurde. Im zugehörigen Kontrollversuch Nr.8 steigt der Extinktionswert ebenfalls an, daher sind keine Wiederauflösungsvorgänge festzustellen. Bei der alleinigen Zugabe des Resuspensionspartners (Versuch Nr.1-Kontrollversuch Nr.3) sind in ihrem Verlauf ähnliche Ergebnisse festzustellen, eine Resuspension kann daher nicht in die Schlussfolgerungen eingeschlossen werden

**4.6.3.8 Versuch 46: Resuspensionspartner: Das Heteropolymer Poly-Glutamin-Alanin in einem Molekülverhältnis von 6:4 und einem Molekulargewicht zwischen 20000 und 50000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1650)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glu-Ala		ohne Glu-Ala		mit Glu-Ala		ohne Glu-Ala	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,018	0,009	0,016	0,010	0,013	0,007	0,013	0,008
5.Tag	0,009	0,007	0,032	0,036	0,010	0,007	0,014	0,010
10.Tag	0,021	0,013	0,035	0,032	0,012	0,007	0,011	0,060

**Tabelle 61:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin-Alanin



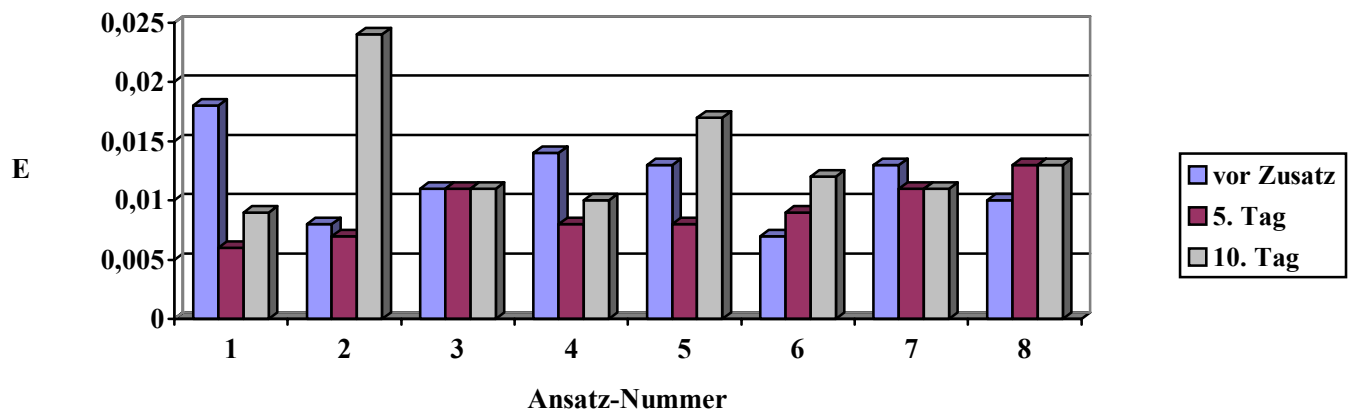
**Abbildung 55:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin-Alanin

Die Kontrollversuche (Nr. 3, 4 und 8) ,die ohne Zugabe der zu testenden Substanz durchgeführt werden, bieten teilweise starke Extinktionswiederanstiege. Betrachtet man die Ansätze, die Versuchssubstanz enthalten, so ist ein deutlich vermindertes Steigen der Extinktion festzustellen. Da zum Nachweis einer Resuspension isolierte Wertezuwächse in den Ansätzen, die Resuspensionspartnersubstanz und/oder Immunkomplexe enthalten, nötig ist, können in diesem Experiment keine die Cholesteroltransportkapazität des Modellserums steigernde Stoffkonstellationen festgestellt werden.

**4.6.3.9 Versuch 47: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Tyrosin mit einem Molekülverhältnis zwischen 10000 und 40000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 1800)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Tyrosin		ohne Tyrosin		mit Tyrosin		ohne Tyrosin	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	Mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,018	0,008	0,011	0,014	0,013	0,007	0,013	0,010
5.Tag	0,006	0,007	0,011	0,008	0,008	0,009	0,011	0,013
10.Tag	0,009	0,024	0,011	0,010	0,017	0,012	0,011	0,013

**Tabelle 62:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Tyrosin



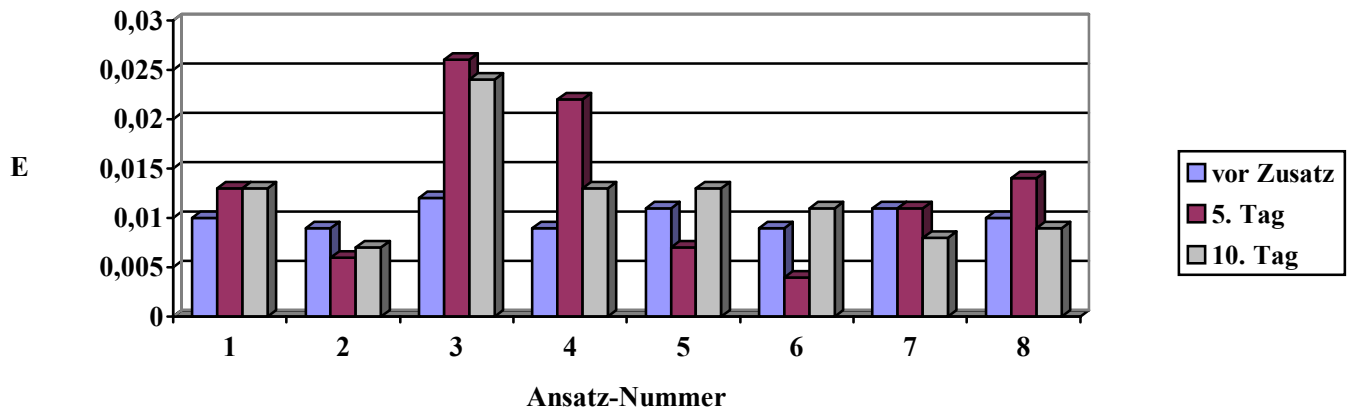
**Abbildung 56:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Tyrosin

Das Einwirken der Aminosäure Tyrosin führt zu einem deutlichen Wiederanstieg der Extinktion, welcher am deutlichsten in Versuch Nr.2 ausfällt. Hier steigt der Wert nach Zuführen kinetischer Energie bis auf 13% der Ausgangsextinktion, im zugehörigen Kontrollversuch Nr.4 ist dieser Anstieg nur minimal ausgeprägt. Immunkomplexe und der Resuspensionspartner zusammen bewirken ebenfalls ein vermehrtes Herauslösen von Cholesterin aus dem am Boden der Microtubes befindlichen Präzipitate bis auf 11% des Ausgangswertes.

**4.6.3.10 Versuch 48: Resuspensionspartner: Das Polypeptid Poly-L-Glutaminsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 15000 Dalton (Sigma-Chem. Produkt-Nr. P 4636)**

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
	ohne IC				mit IC			
	mit Glutaminsr		ohne Glutaminsr		mit Glutaminsr		ohne Glutaminsr	
	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen	ohne mischen	mit mischen
vor Zug.	0,010	0,009	0,012	0,009	0,011	0,009	0,011	0,010
5.Tag	0,013	0,006	0,026	0,022	0,007	0,004	0,011	0,014
10.Tag	0,013	0,007	0,024	0,013	0,013	0,011	0,008	0,009

**Tabelle 63:** Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutaminsäure



**Abbildung 57:** Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure

Dieses Experiment zeigt bei Anwesenheit von Immunkomplexen und der zu testenden Substanz L-Glutaminsäure einen Anstieg auf 9% der Ausgangsextinktion (Versuch Nr.5). der zugeordnete Kontrollversuch Nr.7 zeigt diesen Verlauf nicht, im Gegenteil ist hier ein weiterer Abfall zu verzeichnen. So können Rückschlüsse auf einen resolubilisierenden Effekt der beiden Reaktionspartner zugelassen werden. In den restlichen Ansätzen sind durch Abnahme der Extinktion dokumentierte Präzipitationseffekte festzuhalten, die jedoch in einem sehr geringen Maß auftreten.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation sollten drei verschiedene Versuchsanordnungen dazu führen, plasmadestabilisierende Wechselwirkungen zwischen Immunkomplexen, dem Modellserum und verschiedenen definierten und in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften bekannten Polypeptiden nachzuweisen und darüber hinaus, eine bestehende Aggregationstendenz zu verhindern. Ziel der ersten beiden Abschnitte (**Versuche 1-24**) war, durch Modulation der Milieubedingungen (vom physiologischen zum sauren), durch Zugabe die Bindungskräfte beeinflussender Substanzen TCA, GA, PVP und weiterhin durch Zugabe oder Nicht-Zugabe von Immunkomplexen eindeutige Trendlinien herauszuarbeiten. Dabei ergaben sich Versuchskonstellationen, in denen eine bestehende Präzipitationsneigung verstärkt oder abgeschwächt werden sollte.

Zusätzlich wurden den Ansätzen synthetische Polypeptide zugefügt, deren besonderer Vorteil ihre genau bekannte Struktur ist und die den Einfluss physiologisch vorkommender, z.B. im Rahmen einer durch T-Helfer-Zellen induzierten persistierenden Makrophagenhyperaktivierung sezernierter Proteine im Bezug auf ihre physikalisch-chemischen Wechselwirkungen simulieren sollten. Durch Kenntnis der intramolekularen Ladungsverteilungen konnten wichtige Detailinformationen über den Prozess der Serumdestabilisierung gewonnen werden:

Durch geeignete Zusammenstellung der Polypeptide konnte nicht nur zwischen positiv (Diaminomonocarboxyaminosäuren) und negativ (Monoaminodicarboxyaminosäuren) geladenen Makromolekülen, sondern auch zwischen stärker (z.B. Poly-L-Lysin) und schwächer (z.B. Poly-L-Arginin) geladenen Polymeren unterschieden werden. Was die Heteropolymere betrifft, so war die Möglichkeit gegeben, zwischen apolaren und polaren Domänen einerseits, sowie positiv und negativ geladenen Gruppen andererseits, zu variieren. Weiterhin konnte durch Zugabe von Trichloressigsäure bzw. Glutaraldehyd eine partielle Steigerung der Hydrophobie der Reaktionspartner erzielt werden, die mit einer gleichzeitigen Verstärkung des kationischen Charakters der  $\text{NH}_3$ -Seitengruppen einhergeht und die so aus dem Interaktionsgeschehen ausgeschaltet werden sollten[20].

Der dritte Abschnitt war darauf ausgelegt, bereits stattgefundenen Präzipitationsvorgänge durch Zugabe ausgewählter Polypeptide wieder rückgängig zu machen und so durch direkte Beeinflussung der physikalisch-chemischen Wechselwirkungen die Plasma-cholesterolkapazität zu erhöhen, bzw. Fällungserscheinungen von Cholesterin zu verhindern. Die Aggregationsneigung zwischen Immunkomplexen und Lipoproteinen entsteht u.a. aufgrund von Coulombschen Anziehungskräften in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Auch apolare Wechselwirkungen wie die Van-der-Waal-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen tragen zu den intermolekularen Anziehungsvorgängen bei und begünstigen so die Ausbildung größerer Aggregate, in deren Folge es zu den plasmadestabilisierenden Ausfällungserscheinungen kommt.

Die Versuche Nr.1-8 mit der Aminosäure Lysin folgten alle dem gleichen Versuchsaufbau, der es ermöglichte, IC-haltige Ansätze mit solchen ohne IC vergleichen zu können. Dabei wurde die Zugabe der IC zum Versuchsbehälter zeitlich variiert, um so eine eventuell bestehende Aggregationsneigung mit den Bestandteilen des Modellserums oder mit der Testsubstanz sichtbar machen zu können.

Betrachtet man die Ansätze-Nr. 1, 4 und 7 der ersten drei Versuchsreihen (**S.25-27**), so kann zunächst ein pH-Wert, der sich dem physiologischen Bereich nähert, dafür verantwortlich gemacht werden, dass optimale Voraussetzungen für ein Interagieren der beteiligten Substanzen geschaffen wurden. Sowohl die Testsubstanz alleine, als auch in Kombination mit den Immunkomplexen führten zu einer ausgeprägten Plasmadestabilisierung nach bereits 48 Stunden. Die Immunkomplexe verstärken die Präzipitationsneigung der im Modellserum enthaltenen Lipoproteinvesikel.

Einen zusätzlichen Einfluss auf die Intensität der Präzipitatbildung hatte in diesen Versuchen das Molekulargewicht. Mit zunehmendem Gewicht konnte eine entsprechende verstärkte Abnahme von Cholesterin im Überstand der Probengefäße gemessen werden. Die Größe eines Moleküls und das damit verbundene erhöhte Aufkommen von aggregationsfreudigen funktionellen, polaren oder apolaren Gruppen führen also zur verstärkten Bildung von Lipoprotein-Immunkomplex Sedimenten, deren Existenz zum Teil bereits makroskopisch zu erkennen war: Während die anfänglich in allen Ansätzen vorhandene Trübung in den Ansätzen ohne IC-Zugabe während aller Messtage erhalten blieb, bildete sich in den immunkomplexhaltigen Ansätzen ein sichtbares Sediment am Boden der Microtubes.

Da auch die Milieubedingungen, die zu schnelleren und effizienteren Wechselwirkungen von Immunkomplexen mit cholesterolhaltigen Lipoproteinen führen könnten, genauer betrachtet werden sollten, wurde den entsprechenden Ansätzen 0,1 molare Salzsäure zugesetzt. Dabei wurden in den Versuchsbehältern zum Teil „Extrembedingungen“ geschaffen, die jedoch nötig waren, um Veränderungen, die im Organismus im Lauf von Jahren und Jahrzehnten entstehen, zu beschleunigen und zum Zeitpunkt der Messungen erkennbar zu machen.

Die Versuche Nr. 4 und 5 zeigen eine solche pH-Verschiebung und die damit verbundene Steigerung der Präzipitationsrate. Möglicherweise hängt der Effekt mit den unterschiedlichen isoelektrischen Punkten der verwendeten Heteropolymere zusammen.



In Versuch Nr. 4 (**S.28**), in dem Lysin (IP bei pH 9,95) und Tyrosin (IP bei pH 5,66) zu gleichen Teilen verwendet werden, kommt es zu einer insgesamt ausgeprägten (pH 7 und 5) und zusätzlich leichten Steigerung der Präzipitationsrate mit irreversiblen Absinken bis auf 1% der Ausgangsextinktion bei pH 5. Betrachtet man die Gesamtladung des Moleküls, so ergibt sich für den physiologischen Bereich ein Überwiegen der negativen Ladungen, was aufgrund der elektrostatischen Anziehungskräfte eine Präzipitation mit den negativ geladenen Lipoproteinen ermöglicht.

Versuch Nr. 5 (**S.29**) zeigt neben einer insgesamt schwächer ausfallenden Destabilisierungsreaktion die Tendenz, bei pH 7 effizientere Auswirkungen auf das Modellserum zu haben. Das in seiner Aminosäurezusammensetzung identische Heteropolymer liegt hier in einem Molekülverhältnis von 4:1 vor, es resultiert also bei Überwiegen von Lysin im sauren Milieu eine überwiegend positive Gesamtladung, die den im Versuch-Nr.4 dokumentierten Effekt abschwächt.

In Versuch Nr.6 und 7 (**S.30,31**) findet das Heteropolymer Lysin-Alanin mit unterschiedlichen Molekülverhältnissen Verwendung. Sind die einerseits hydrophob, andererseits hydrophilen Polypeptide zu gleichen Teilen im Ansatz enthalten, kommt es bei pH 7 zu einer Destabilisierungstendenz, die durch Anwesenheit von Immunkomplexen eher abgeschwächt wird. Überwiegt in Versuch Nr.7 der positiv geladene und hydrophile Lysinanteil im Polymer, so kann ein eindeutiger Zusammenhang mit der Anwesenheit von Immunkomplexen im Bezug auf die Präzipitationsstärke festgestellt werden. In den immunkomplexfreien Ansätzen herrschen stabile Kräfteverhältnisse, während die Zugabe von Immunkomplexen zu ausgeprägter Extinktionsschwächung und dem damit verbundenen Absetzen von Konglomeraten aus Lipoproteinen und Immunkomplexen und dem Heteropolymer führt.

Der IP der Immunkomplexe wird zwischen pH 5,5 und 7,5 [1] angegeben, das bedeutet für einen pH-Wert des Probenmilieus ein ebenfalls verstärktes Vorhandensein von positiven Ladungen, die dann sehr effizient mit den negativ geladenen Lipoproteinen interagieren können.

Versuch Nr.8 (**S.32**) verwendet schließlich noch ein Zufallspolymer aus den beiden Aminosäuren. Obwohl das Molekülverhältnis hier nicht bekannt ist und damit keinerlei Aussagen über die intramolekulare Ladungsverteilung getroffen werden kann, kann dieser Versuch trotzdem als Kontrollversuch für die vorher durchgeführten angesehen werden.

Die Entscheidung, ob es zu einer Plasmadestabilisierung kommt oder nicht, hängt offensichtlich von sehr exakt zueinander stehenden Ladungsverteilungen ab. Kommt es nur zu einer minimalen Konfigurationsänderung, wie hier in dem Zufallspolymer, so wird der

Präzipitationsvorgang nicht in Gang gesetzt und nicht einmal die durch ihre Größe bedingt stark polaren Immunkomplexe wirken dann destabilisierend.

Es soll noch erwähnt werden, dass die Reihenfolge der Zugabe der Immunkomplexe zu den Versuchsbehältern insgesamt nur sehr geringen Einfluss auf die Intensität der Reaktion hatten.

Versuche 9-13 (**S.33-41**): Die ersten drei Versuche dieser Gruppe betrachten wieder Polypeptide, die nur aus der Aminosäure Lysin mit zunehmendem Molekulargewicht synthetisiert sind. Im Unterschied zu den Versuchen Nr.1-3 werden die Reaktionspartner noch dem Einfluss von Trichloressigsäure, Glutaraldehyd und Polyvinylpyrrolidon ausgesetzt. Hier kann ebenfalls eine Abhängigkeit der Fähigkeit, Immunkomplexe und Lipoproteinvesikel zu präzipitieren, vom Molekulargewicht des Polypeptids festgestellt werden. Je größer dieses Gewicht ist, desto größer wird auch die positive Gesamtladung des Moleküls, was es den bei physiologischem pH-Wert negativ geladenen Immunkomplexen erlaubt, durch polare Anziehungskräfte angezogen, mit dem Polypeptid zu interagieren. Die ebenfalls negativ geladenen Lipoproteinvesikel werden erst dann mit in den Komplex miteinbezogen, wenn die entgegengesetzten Ladungsdifferenzen groß genug sind und dies ist bei höheren Molekulargewichten der Fall. Dann kommt es jedoch sofort zur Präzipitation und damit zum Abfall der Cholesterinfraktion aus dem Überstand. Die zusätzlich modulierenden Substanzen unterstützen diesen Trend eindeutig (**vgl. Tabellen 9-14; Abbildungen 9-14**).

In den Versuchen Nr.12 und 13 kommt ein Heteropolymer zum Einsatz, welches in der Lage ist, die Plasmadestabilisierung zu verstärken. Der Grund dafür ist auch hier wieder bei der intramolekularen Ladungsverteilung zu suchen. Setzt man den Modellseren Polymere mit genau definierten Molekülverhältnissen zu –in diesem Beispiel mit einem Molekülverhältnis von 1:1, so kommt es auch ohne Anwesenheit von Immunkomplexen zu Fällungserscheinungen im physiologischen Milieu. Der isoelektrische Punkt der Aminosäure Alanin, der nahe bei dem der Immunkomplexe liegt, ermöglicht eine optimale Annäherung aufgrund polarer Anziehungskräfte zwischen Lipoproteinvesikel und dem Heteropolymer. Die entstehende Präzipitationstendenz ist als Folge dieser Molekülannäherung zu verstehen.

Fügt man jetzt noch negativ geladene Immunkomplexe hinzu, so verstärkt sich dieser Effekt und erfährt eine zusätzliche Steigerung unter dem Einfluss der hydrophobizierenden, die apolaren Anziehungskräfte steigernden Substanzen. Ist das Heteropolymer jedoch in seiner Synthesesequenz zufällig erstellt, kann man also keine Aussage über die genaue Lokalität polarer oder hydrophober Domänen treffen, so findet sich diese Strukturunregelmäßigkeit auch in den Versuchsergebnissen wieder: Versuch Nr.13 (**S.41**) enthält ein Zufallskopolymer mit einem

relativ zu den Vorversuchen niedrigen Molekulgewicht, in dem es zu sehr geringfügigen Extinktionsänderungen kommt und zwar nur dann, wenn der negativ-polare Einfluss der Immunkomplexe im leicht sauren Milieu zum Tragen kommt (**vgl. Abb.16, Ansatz 13-16**)

Versuche Nr.14-18 (**S.43-47**) untersuchen das Polypeptid Glutamin und Heteropolymere, die immer zu einem Teil Glutamin beinhalten. Die untersuchten Makromoleküle wurden bis auf eine Ausnahme so ausgewählt, dass ihre isoelektrischen Punkte nahe beisammen liegen und zwar in einer Spanne zwischen pH 5,65 und 5,95. So konnten die apolaren Wechselwirkungen genauer untersucht werden:

Als Ergebnis zeigt sich der eindeutige Einfluss von Immunkomplexen auf das Präzipitationsverhalten der Lipoproteinfraktion in den Modellseren. Ihr Fehlen hat stabilere Molekülverhältnisse zur Folge und die Extinktionsänderungen sind nur sehr gering ausgeprägt (**vgl. Tab 25-29**). Sind jedoch Immunkomplexe vorhanden (ihr IP bewegt sich ebenfalls im oben genannten pH-Bereich), so liegen sich ausreichend viele hydrophobe Domänen gegenüber und die Fällungsintensität nimmt zu.

Die in den Versuchen Nr. 19-21 (**S.48-50**) verwendete stark saure Glutaminsäure destabilisiert das Serumcholesterin nur bei reduzierten pH-Werten und nur in gleichzeitiger Gegenwart von Immunkomplexen. Dieser Wirkungsmechanismus könnte an der Interaktion zwischen den bei pH 5,0-6,0 positiv geladene Immunkomplexen und den beiden negativ geladenen Lipoproteinvesikeln und Glutaminsäure liegen(**vgl. Tab.30-32**).

Das in Versuch Nr. 22 (**S.51**) verwendete Histidin besitzt eine Imidazolgruppe. Solch eine Gruppe ist u.a. durch einen  $\pi$ -Bindungsanteil charakterisiert. Der isoelektrische Punkt liegt mit pH 7,74 dem physiologischen sehr nahe. Nach den bisher aufgetretenen Trendverläufen wäre deshalb eine ausgeprägte Präzipitation aufgrund der apolaren Anziehungskräfte zwischen den bei neutralem pH negativ geladenen Lipoproteinen und dem Polymer alleine zu erwarten, die auch tatsächlich stattfindet (**vgl. Tab. 33.**)

In diesem Bereich liegen auch die Immunkomplexe eher negativ geladen vor, es bilden sich hydrophobe Domänen, welche sich aneinander annähern und schließlich zur Aggregation mit den cholesterolhaltigen Lipoproteinen führen und ausfallen (**vgl. Tab. 34**). Sobald sich das Ansatzmilieu zum Sauren hin verändert wird, bleiben die Effekte aus, auch Immunkomplexe haben hierauf keinen Einfluss.

Insgesamt betrachtet kommt es in den Ansätzen, die Immunkomplexe enthalten häufiger zu einer verstärkten Präzipitationsneigung

Die ungeladene, hydrophobe Aminosäure Tyrosin führt, als Polypeptid vorliegend, zur Ausbildung von Konglomeraten mit LDL/VLDL. Versuche Nr.23 und 24 (**S.52-53**) zeigen diesen Verlauf. Je mehr hydrophobe Domänen in einem Molekül enthalten sind, desto stärker werden die Abstossungskräfte durch die umgebende Hydrathülle. Dem Prinzip des geringsten Energiegehaltes folgend, orientieren sich die Domänen so zueinander, dass die der umgebenden Hydrathülle zugewandte Oberfläche minimiert wird. Die Lipoproteine beteiligen sich aufgrund ihrer apolaren Struktur an den Zusammenschlüssen. Kommen nun noch -entzündungsbedingt- Immunkomplexe dazu, so wird die Apolarität des Aggregationsmolekül so gross, dass das normalerweise ausgeglichene Gleichgewicht zwischen Anziehungs- und Abstoßungskräften nicht mehr aufrecht erhalten werden kann und es kommt zur Präzipitation. Aufgrund seiner Masse sinkt der Komplex auf den Grund des Ansatzbehälters und kann dort auch makroskopisch erkannt werden. In Versuch-Nr.24 ist solch ein Effekt sehr deutlich nachzuvollziehen (**vgl. Tab 35**): auch ohne Anwesenheit von Immunkomplexen wird der Cholesterolgehalt des Überstandes geschwächt, kommen Aggregate aus IC und LDL dazu, kommt es zu einer Verstärkung der Präzipitation bei pH 7 und 5. Die Reaktion verläuft unabhängig von der zeitlichen Reihenfolge der Zugabe der Immunkomplexe.

Der zweite Teil der Arbeit entstand aus der Hypothese der physikalisch-chemischen Einflussnahme von artifiziellen Polypeptiden auf die Gesamtstabilität eines Plasmasystems. Wenn solche Peptide, die in ihren Eigenschaften genau definiert sind und so theoretische Erwartungen über ihre Wirkung auf die Plasmaastabilität zulassen-die sich in einer Vielzahl von Experimenten dieser und anderer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe auch bestätigt haben- dann liegt die Überlegung nicht fern, nach umgekehrten Effekten, also solchen, die die Cholesteroltransportkapazität des Plasmas ansteigen lassen, zu suchen.

Zu diesem Zweck wurden aus den bis dahin untersuchten Substanzen solche ausgewählt, die einen besonders deutlichen Trendverlauf der Präzipitation aufzuweisen hatten.

Neben der Intensität der Sedimentierung war ein weiteres Auswahlkriterium die Geschwindigkeit, so dass sich drei Gruppen mit langsamer (Poly-L-Asparagin), mittlerer (Poly-L-Arginin) und schneller (Poly-L-Arginin-Tyrosin) Einflussnahme heraus-kristallisierten.

Nun wurde jeweils ein Vertreter dieser „Hauptgruppen“, wie gewohnt, einem Ansatzbehälter mit Modellserum zugesetzt und die Zeitspanne abgewartet, nach der es in den Vorversuchen zu keiner weiteren Extinktionsänderung mehr gekommen war. Die Systeme haben also ihren neuen Stabilitätszustand wieder erreicht, die Präzipitation ist abgelaufen. Jetzt konnten, in gleicher Weise wie bisher, erneut Testsubstanzen in den Versuchsbehälter zugegeben werden,

die Anfangsextinktion und der weitere Verlauf photometrisch bestimmt werden. Die Ergebnisse werden nachfolgend zusammengefasst.

In den Versuchen Nr. 25-48 (**S.55-81**) wurden ausgewählte Polypeptide Präzipitationssystemen unterschiedlicher Geschwindigkeitsklassen zugesetzt. Die Ansätze unterscheiden sich durch die An- oder Abwesenheit von Immunkomplexen und durch das zusätzliche Einwirken von kinetischer Energie, die durch einmaliges Schütteln der Versuchsbehälter nach Zusatz der Testsubstanz zugeführt wurde.

Insgesamt betrachtet treten die Resolubilisierungstendenzen im Vergleich zu den vorausgegangenen Präzipitationen seltener und in geringerem Ausmaß auf. Man kann sie ihrem Charakter nach in temporäre Wiederanstiege der Extinktionswerte (**vgl. Tab. 38, 49, 59**) oder in endgültige –auf den Zeitrahmen der Messungen bezogene- Wiederanstiege (**vgl. Tab. 40, 50, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62**) unterteilen. Zum einen dürfte dies an den langen Standzeiten der reagierenden Testansätze liegen. Nach der letzten Messung am zehnten Tag sind bis zu zwei Wochen vergangen, in denen das in-vitro-System keinerlei Substituierung beteiligter Inhaltsstoffe erfahren hat, wie es in einem in vivo-System möglich ist. Ein weiterer Punkt könnte das Zusammenspiel von zu vielen intermolekularen Kräftevektoren sein. Prinzipiell ist eine Wiederauflösung chemisch problemlos durchzuführen, aber mit der Prämisse, physiologisch vorkommende und verträgliche und im besten Fall-applizierbare Polypeptide zu verwenden, müssen die Erwartungen bezüglich der Ergebnisse deutlich eingeschränkt werden. Offensichtlich müssen äußerst exakte Versuchsbedingungen erfüllt sein, um die einmal präzipitierten Konglomerate so angreifen zu können, dass es zu einer Herauslösung von cholesterolhaltigen Vesikeln kommen kann. Auch die Konstellation des umgebenden Milieus scheint hier deutlich mehr Einfluss auf den Ablauf zu haben, als im umgekehrten Fall, da dort Präzipitationstendenzen über einen größeren pH-Bereich hinweg beobachtet werden konnten.

Auffällig häufig konnten Resuspendierungstendenzen in der Versuchsgruppe festgestellt werden, die mit dem Heteropolymer Poly-Arginin-Tyrosin vorbehandelt wurden. Die isoelektrischen Punkte aller Stoffe, die in der Lage waren, die Präzipitate zumindest teilweise wieder rückgängig zu machen, lagen immer deutlich niedriger als der pH-Wert des Gesamtsystems. Die deutlichsten Ergebnisse zeigte das stark saure Poly-L-Glutamat (**vgl. Abb 55, Ansatz 1**), welches die am letzten Tag gemessene Extinktion wieder bis auf 70% des Startwertes anzuheben vermochte. Die Ursache ist, ähnlich wie bei den Fällungsversuchen wieder in der Polarität der Substanzen zu suchen. Die erneut auf das Präzipitat einwirkenden stark polaren Kräfte scheinen eine phasische Anordnung des Cholesterols an der Oberfläche der Reaktionsgefäße zu unterstützen, während die Immunkomplexe, die sich untereinander durch stabile

Disulfidbrücken verbunden haben, am Boden zurückbleiben. So kann auch der temporäre Wiederanstieg am Beispiel der Aminosäure Poly-L-Ornithin (**vgl. Ansätze-Nr.1, 2, 5 und 6 in Versuch 25**) erklärt werden. Sie ist in der Lage, einen deutlicher Wiederanstieg des Cholesterolgehaltes im Überstand auszulösen. Immunkomplexe schwächen den Effekt etwas ab und insgesamt ist der Resolubilierungsprozess nur temporärer Art. Fünf Tage nach Erreichen der maximalen Extinktion, die 13% über der Anfangsextinktion der Präzipitiersubstanz Poly-L-Arginin der Vorbereitungsreaktion liegt und damit auf ein zusätzliches Herauslösen von Lipoproteinen aus dem Plasmaverband ( z.B. an Albumin gebundenes LDL) Hinweis geben könnte, sinken die Werte in allen Ansätzen wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück. Der Kräfteinfluss des zugesetzten Polypeptides wird also wieder abgeschwächt und die Anziehung der immer noch persistierenden Immunkomplexe überwiegt erneut.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Bildung und anschließende Präzipitation von IC-Lipoprotein-Komplexen experimentell in-vitro ausreichend bewiesen werden konnte.

Die IC-Lipoprotein-Komplexe, deren Entstehung durch zahlreiche Faktoren wie verstärkte T-Helfer<sub>2</sub>-Zellexpression, persistierende Makrophagenaktivierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase in Endothelzellen gefördert werden, sind durch Fc-Antikörper-Markierung für den Makrophagen als Substrat erkennbar und werden deshalb via Scavenger-Pathway entfernt. Da dieser Stoffwechselweg keiner negativen Rückkoppelung unterliegt, trägt dies zur Überladung der Makrophagen mit Cholesterol bei und fördert ihre Umwandlung in Schaumzellen. Somit sind diese Komplexe als potentiell atherogen einzustufen.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die IC-Lipoprotein-Komplexe bevorzugt bei erniedrigtem pH und in Anwesenheit von Modellproteinen, die den Einfluss von Sekretionsprodukten (hyper-)aktivierter Makrophagen simulieren und den Vorteil ihrer genau bekannten Struktur und Ladungsverteilung bieten, entstehen und ausfallen.

Ähnliche Bedingungen sind auch im Rahmen immunologischer Überreaktionen erfüllt, es wäre also vorstellbar, dass sich die bisher bekannten atherogenen Risikofaktoren um ein weiteres Mitglied vermehren könnte.

Endgültige Aussagen zu einer möglichen pathologischen Einflussnahme der hier nachgewiesenen IC-Lipoprotein-Komplexe können jedoch ohne weitere Versuche (z.B. in klinischen Studien) nicht gemacht werden.

## 6 Zusammenfassung

Immunkomplexe aus modifizierten LDL und spezifisch dagegen gebildeten Antikörpern tragen zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion in den Gefäßwänden bei und sind damit als wichtiger Bestandteil der Atherogenese anzusehen. Die Erforschung therapeutischer Substanzen, die entweder solche Immunkomplexe auflösen oder ihre Entstehung verhindern können, ist daher von großem medizinischen Interesse. Als Voraussetzung für derartige Forschungsvorhaben wäre eine steuerbare und beschleunigte Einwirkung von Immunkomplexen auf ein möglichst natürliches in-vitro Versuchssystem wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die physikalisch-chemischen Interaktionen und die daraus resultierende Aggregationsneigung zwischen unspezifischen IgG-Immunkomplexen und cholesterolhaltigen Lipoproteinvesikeln in Anwesenheit verschiedener definierter Polypeptide bei unterschiedlichen Milieubedingungen untersucht.

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen treffen:

Immunkomplexe alleine bewirken im Zeitraum der Versuchsdauer nur geringgradige pH-abhängige Schwächung der Präzipitation. In Kombination mit 75% der getesteten Polypeptide jedoch verstärken Immunkomplexe die Präzipitation von Lipoproteinvesikeln. Diese Interaktion ist sowohl vom pH-Wert des Versuchsansatzes wie auch vom isoelektrischen Punkt des beteiligten Polymers abhängig.

Polymere mit vielen polaren Seitenketten können alleine das Modellsystem stabilisieren. Immunkomplexe verstärken lediglich dieses Phänomen. Dagegen benötigen Polymere mit vorwiegend apolaren Seitenketten die Anwesenheit von Immunkomplexen zur Präzipitation. Als eine weitere Einflussgröße auf die Präzipitationsgeschwindigkeit stellte sich die Molekülgröße der eingesetzten Polymere dar. Zunehmende Molekülgröße verbessert die Möglichkeit der Polymere, in beschleunigender Weise auf das in-vitro-Modell einzuwirken und Cholesterolausfällungen aus dem Plasmaverband zu verstärken.

Durch Auswertung der im ersten Teil der Arbeit gewonnenen Ergebnisse konnte ein in-vitro System etabliert werden, das die Präzipitation von Immunkomplexen und Lipoproteinen unter kontrollierten Bedingungen steuerbar macht. Dieses System wurde anschliessend eingesetzt, um Substanzen zu identifizieren, die vorhandene Präzipitate wieder auflösen können.

Durch erneuten Einsatz von den schon bekannten Polypeptiden sollten deren Wirkung auf abgelagerte Präzipitatkomplexe untersucht werden. Es haben sich vorübergehende und dauerhafte Resolubilisierungstendenzen herauskristallisiert, die allerdings eher selten und in ihrer Intensität weitaus schwächer als ihre Umkehrreaktionen zu beobachten waren. Dies könnte an der Vielzahl von elektrostatischen Wechselwirkungen liegen, die nur bei optimalsten synergistischen Wirkungsübereinstimmung zu einer Resuspension führen können, andererseits ist jedoch auch ein zu großes Zeitfenster, in welchem es im geschlossenen System zu Stagnations- oder Mazerationserscheinungen kommen kann, als Ursache denkbar.

Abschliessend lässt sich feststellen, daß eine Interaktion zwischen unspezifischen Immunkomplexen und cholesterolhaltigen Lipoproteinen im Serum-unterstützt von polaren und apolaren Polypeptiden und saurem pH-Wert- sowohl für die Präzipitation, als auch in geringerem Maße für die Resuspendierung-gezeigt werden konnte.

Die Grundlagenforschung könnte sich weiter auf die physikalisch-chemischen Zusammenhänge der Plasmastabilität konzentrieren, um Substanzen zu finden, die in der Lage sind, die destabilisierenden Eigenschaften der Immunkomplexe sowie der Lipoproteine zu entschärfen und so die Atheroskleroseentstehung und die Entstehung anderer Ablagerungskrankheiten zu verhindern. Unsere Messmethode bietet dazu einige Variationsmöglichkeiten, z.B. könnte am Grund der Messbehälter Makrophagen angesiedelt und so die Komponente der Phagozytose mit in den Versuchsaufbau einbezogen werden.

Endgültige Aussagen zur Pathogenität der in-vitro nachgewiesenen IC-Lipoprotein-Komplexen und die mögliche therapeutische Verwendung von Polymeren sollen jedoch weiteren tierexperimentellen und klinischen Studien vorbehalten bleiben.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Allen, R. und B. Budowle, *Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids. Selected Techniques*. 1994, Walter de Gruyter: Berlin, New York: S.111-113.
2. Baenkler, H., *Das Immunsystem*, in *Innere Medizin*. 2000, Hippokrates Verlag: Stuttgart. S.1608-09.
3. Benditt, E. und J. Benditt *Evidence for the monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1973(70): S.1753-1756.
4. Cantor, H. and A. Rao, *Regulation of the Immune Response*. 1995. S.65-66.
5. Cottier, H., *Pathogenese*. 1980, Berlin, New York: Springer-Verlag. S.1109-1112.
6. Dinauer, M., *The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1993. **30**(4): S.329-69.
7. Dunon, D., L. Piali, und B. Imhof, *To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm*. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(5): S.714-23.
8. Epstein, S., J. Zhu, M. Burnett, Y. Zhou, G. Vercellotti, und D. Hajjar, *Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry [editorial]*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(6): S.1417-20.
9. Faruqi, R. und P. Di Corleto, *Mechanisms of monocytes recruitment and accumulation*. *Br Heart J*, 1993. **69**: S.19-29.
10. Fuster, V., R. Ross, und E. Topol, *Atherosclerosis and coronary heart disease*, ed. L.-R. Publishers. 1996, Philadelphia, New York: S. 25-41.
11. Geng, Y., J. Holm, S. Nygren, M. Bruzelius, S. Stemme, und G. Hansson, *Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon-gamma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(11): S.1995-2002.
12. Girndt, J., *Herz- und Kreislaufkrankheiten durch Arteriosklerose. Ursachen, Erscheinungsformen und Behandlungsmöglichkeiten*. 1994, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. S.13-19, 20, 104-109.
13. Hansson, G., *Immunological control mechanisms in plaque formation*. *Basic Res Cardiol*, 1994. **89** Suppl **1**: S. 41-6.
14. Hansson, G., X. Zhou, E. Tornquist, and G. Paulsson, *The role of adaptive immunity in atherosclerosis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **902**: S. 53-62; discussion S.62-4.
15. Hegele, R., *The pathogenesis of atherosclerosis*. *Clin Chim Acta*, 1996. **246**(1-2): S. 21-38.

16. Held, H., *Pflanzenbiochemie*. 1.Auflage ed, ed. S.A. Verlag. 1996, Heidelberg, Berlin, Oxford: S.99-107.
17. Holland, J., L. Ziegler, und J. Meyer, *Atherogenic levels of low-density lipoprotein increase hydrogen peroxide generation in cultured human endothelial cells: possible mechanism of heightened endocytosis*. J Cell Physiol, 1996. **166**(1): S.144-51.
18. Hornbostel, H., W. Kaufmann, W. Siegenthaler, *Innere Medizin in Praxis und Klinik*. 4.Auflage ed. 1992, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag: S.2.7-2.9.
19. Isselbacher, K. und K. Schmailzl, *Harrisons Innere Medizin*. 13. Auflage ed. Vol. Band 1. 1995, Berlin, Wien:Blackwell-Wissenschaftsverlag: S.528-536, 1124-1129, 1269, 1297-1326, 2851.
20. Karlson, P., D. Doenecke, und J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 1994, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag: S.2;356-357.
21. Keller, R., *Immunologie und Immunopathologie*. 4.Auflage ed. 1994, Stuttgart: Georg Thieme Verlag: S.35-41.
22. Kleine, S., *G-Proteine:Universelle Schalter und Regler im Zellgeschehen*. Biologie in unserer Zeit, 1995. Heft **25**: S.44-50.
23. Krieger, M., S. Acton, J. Ashkenas, A. Pearson, M. Penman, und D. Resnick, *Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): S.4569-72.
24. Leskovar, P., *IC destabilisieren Plasma-Lipoproteine und dürften aktiv an verschiedenen von der Plasma-Destabilisierung ausgehenden pathologischen Prozessen (Atherogenese)beteiligt sein*. unveröffentlicht, 1993: S.1-5;7.
25. Li, P., C. Ferrario, und K. Brosnihan, *Losartan inhibits thromboxane A2-induced platelet aggregation and vascular constriction in spontaneously hypertensive rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32**(2): S.198-205.
26. Libby, P., *Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization*. Am J Cardiol, 2000. **86**(8B): S.3J-8J;discussion 8J-9J.
27. Meyer, J., J. Holland, L. Ziegler, M. Chang, G. Beebe, und M. Schmitt, *Identification of a functional leukocyte-type NADPH oxidase in human endothelial cells :a potential atherogenic source of reactive oxygen species*. Endothelium, 1999. **7**(1): S.11-22.
28. Meyer, J. und M. Schmitt, *A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis*. FEBS Lett, 2000. **472**(1): S.1-4.
29. Munro, J., d.W.J. van, C. Munro, J. Chalmers, und E. Cox, *An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks*. Hum Pathol, 1987. **18**(4): S.375-80.

30. Murakami, T. und N. Yamada, *Modification of macrophage function and effects on atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 1996. **7**(5): S.320-3.
31. Neri, S.G., D. Prisco, F. Martini, A. Gori, T. Brunelli, L. Poggesi, C. Rostagno, G. Gensini, und R. Abbate, *Acute T-cell activation is detectable in unstable angina*. Circulation, 1997. **95**(7): S.1806-12.
32. O'Brien, K., M. Allen, und T. McDonald, *Vascular adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1993. **92**: S. 945-51.
33. O'Brien, K., T. McDonald, A. Chait, M. Allen, und C. Alpers, *Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content*. Circulation, 1996. **93**(4): S.672-82.
34. Ohara, Y., T. Peterson, und D. Harrison, *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): S.2546-51.
35. Organisation, W.H., *the classification of atherosclerotic lesions. Report of a study group*. Technical Report Series, 1958. WHO Tech Rep Ser(143): S.1-20.
36. Palinski, W., E. Miller, und J. Witztum, *Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(3): S.821-5.
37. Paton, P., A. Tabib, R. Loire, und R. Tete, *Coronary artery lesions and human immunodeficiency virus infection*. Res Virol, 1993. **144**(3): S. 225-31.
38. Poredos, P., *Endothelial dysfunction in the pathogenesis of atherosclerosis [In Process Citation]*. Clin Appl Thromb Hemost, 2001. **7**(4): S.276-80
39. Quinn, M., S. Parthasarathy, L. Fong, und D. Steinberg, *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): S.2995-8.
40. Reape, T. und P. Groot, *Chemokines and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1999. **147**(2): S. 213-25.
41. Riede, U., *Entzündungspathologie*, in *Allgemeine und spezielle Pathologie*, H. Wehner, Editor. 1989, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York. S.207-247.
42. Roitt, I., J. Brostoff, und D. Male, *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Vol. 3.Auflage. 1995, StuttgartNew York: Georg Thieme Verlag. S.1-30;178-181; 299-309.
43. Roitt, I., J. Brostoff, und D. Male, *Zellmigration und Entzündung*, in *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 1995, Georg Thieme Verlag: StuttgartNew York. S.174-181.
44. Rosen, G. und B. Freeman, *Detection of superoxide generated by endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(23): S.7269-73.

45. Rosenfeld, M., *Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process*. Semin Reprod Endocrinol, 1998. **16**(4): S.249-61.
46. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): S.801-9.
47. Ruan, Y., K. Takahashi, und M. Naito, *Immunohistochemical detection of macrophage-derived foam cells and macrophage colony-stimulating factor in pulmonary atherogenesis of cholesterol-fed rabbits*. Pathol Int, 1995. **45**(3): S.185-95.
48. Salonen, J., S. Yla-Herttuala, R. Yamamoto, S. Butler, H. Korpela, R. Salonen, K. Nyysönen, W. Palinski, und J. Witztum, *Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis*. Lancet, 1992. **339**(8798): S.883-7.
49. Schwartz, S., *Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): S.S87-9.
50. Shimokama, T., S. Haraoka, und T. Watanabe, *Morphological fate and sequelae of human atherosclerosis: evaluation of immune mechanisms in atherogenesis through immunohistological and ultrastructural analysis*. Pathol Int, 1995. **45**(11): S.801-14.
51. Simmen, H. und J. Blaser, *Analysis of pH and pO<sub>2</sub> in abscesses, peritoneal fluid and drainage fluid in the presence or absence of bacterial infection during and after abdominal surgery*. Am-j-Surg., 1993(165): S.24-27.
52. Steinberg, D., S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, und J.L. Witztum, *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): S.915-24.
53. Stemme, S., B. Faber, J. Holm, O. Wiklund, J. Witztum, und G. Hansson, *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): S.3893-7.
54. Stierle, U., K. Schwabe, and A. Sheikhzadeh, *Einfluß der Cholesterinsenkung auf den Verlauf der koronaren Herzkrankheit. Eine Analyse der Ergebnisse kontrollierter, angiographisch dokumentierter Interventionsstudien*. Deutsche medizinische Wochenschrift, 1995(120): S.1652-1659.
55. Stobbe, H. and G. Baumann, *Innere Medizin, Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten*. überarbeitete und erweiterte 7.Auflage ed. 1996, Berlin Wiesbaden: Ullstein Mosby. S.265-269, 298-301, 557.
56. Till, U. und K. Thielmann, *Pathobiochemie*. 1989: VCH edition medizin. S.138.
57. Truskey, G., R. Herrmann, J. Kait, und K. Barber, *Focal increases in vascular cell adhesion molecule-1 and intimal macrophages at atherosclerosis-susceptible sites in the rabbit aorta after short-term cholesterol feeding*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(2): S. 393-401.

58. Yla-Herttuala, S., W. Palinski, S. Butler, S. Picard, D. Steinberg, and J. Witztum, *Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(1): S.32-40.
59. Zhou, X., G. Paulsson, S. Stemme, and G. Hansson, *Hypercholesterolemia is associated with an T Helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice*. *J.Clin.Invest.*, 1998. **101**(8): S.1717-1725.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Polymere und Heteropolymere (-: keine Angaben des Herstellers).....	17
Tabelle 2: Art und Konzentration der modulierend einwirkenden Zugaben.....	20
Tabelle 3: Inhaltsstoffe der Versuchsansätze und deren Konzentrationen.....	21
Tabelle 4: gemeinsames Pipettierschema zum Versuchstyp 1 ( IC=Immunkomplex, PP=Polypeptid).....	21
Tabelle 5: Pipettierschema A zu Versuchstyp 2 ohne Zusatz von Immunkomplexen.....	22
Tabelle 6: Pipettierschema B zu Versuchstyp 2 mit Zusatz von Immunkomplexen.....	22
Tabelle 7: Pipettierschema zu Versuchstyp 3.....	23
Tabelle 8: Messergebnisse von Poly-L-Lysin bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	25
Tabelle 9: Messergebnisse von Poly-DL-Lysin bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	26
Tabelle 10: Messergebnisse von Poly-L-Lysin bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	27
Tabelle 11: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Tyrosin 1:1 bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	28
Tabelle 12: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Tyrosin 4:1 bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	29
Tabelle 13: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	30
Tabelle 14: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin 3:1.....	31
Tabelle 15: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin bei Variation der Immunkomplexzugabe.....	32
Tabelle 16: Messergebnisse für Poly-L-Lysin ohne Immunkomplexzugabe.....	33
Tabelle 17: Messergebnisse für Poly-L-Lysin mit Immunkomplexzugabe.....	33
Tabelle 18: Messergebnisse für Poly-L-Lysin ohne Immunkomplexzugabe.....	35
Tabelle 19: Messergebnisse für Poly-L-Lysin mit Immunkomplexzugabe.....	35
Tabelle 20: Messergebnisse von Poly-L-Lysin ohne Immunkomplexzugabe.....	37
Tabelle 21: Messergebnisse von Poly-L-Lysin mit Immunkomplexzugabe.....	37
Tabelle 22: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 ohne Immunkomplexzugabe.....	39
Tabelle 23: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 mit Immunkomplexzugabe.....	39
Tabelle 24: Messergebnisse von Poly-L-Lysin-Alanin ohne Immunkomplexzugabe.....	41
Tabelle 25: Messergebnisse Poly-L-Lysin-Alanin mit Immunkomplexzugabe.....	41
Tabelle 26: Messergebnisse von Poly-L-Glutamin.....	43
Tabelle 27: Messergebnisse von Poly-Glutamin-Tyrosin 4:1.....	44
Tabelle 28: Messergebnisse von Poly-Glutamin-Leucin.....	45
Tabelle 29: Messergebnisse von Poly-Glutamin-Lysin-Tyrosin.....	46
Tabelle 30: Messergebnisse von Poly-Glutamin-Alanin 6:4.....	47
Tabelle 31: Messergebnisse von Poly-L-Glutaminsäure.....	48
Tabelle 32: Messergebnisse von Poly-L-Glutaminsäure.....	49
Tabelle 33: Messergebnisse von Poly-L-Glutaminsäure.....	50
Tabelle 34: Messergebnisse von Poly-L-Histidin.....	51
Tabelle 35: Messergebnisse von Poly-L-Tyrosin.....	52
Tabelle 36: Messergebnisse von Poly-Ornithin-Tyrosin.....	53
Tabelle 37: Messergebnisse von Poly-L-Arginin.....	55
Tabelle 38: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Ornithin.....	56
Tabelle 39: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Asparagin.....	57
Tabelle 40: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Prolin.....	58
Tabelle 41: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-DL-Alanin.....	59
Tabelle 42: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glycin.....	60
Tabelle 43: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit DL-Aspartat.....	61
Tabelle 44: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Tryptophan.....	62
Tabelle 45: Messergebnisse von Poly-L-Asparagin.....	63
Tabelle 47: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Ornithin.....	64
Tabelle 48: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Asparagin.....	65
Tabelle 49: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Hydroxy-Prolin.....	66
Tabelle 50: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-DL-Alanin.....	67
Tabelle 51: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glycin.....	68
Tabelle 52: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Asparaginsäure.....	69
Tabelle 53: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit L-Tryptophan.....	70
Tabelle 54: Messergebnisse von Poly-L-Arginin-Tyrosin 4:1.....	71
Tabelle 56: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-DL-Alanin.....	72
Tabelle 57: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Ornithin.....	73
Tabelle 58: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin.....	74
Tabelle 59: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin-Tyrosin.....	75
Tabelle 60: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin.....	76
Tabelle 61: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutaminsäure.....	77

Tabelle 62: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Lysin .....	78
Tabelle 63: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutamin-Alanin .....	79
Tabelle 64: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Tyrosin .....	80
Tabelle 65: Messergebnisse des Resuspensierungsversuches mit Poly-L-Glutaminsäure .....	81

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: graphische Darstellung der Chod-PAP-Präzisionskontrolle .....	19
Abbildung 2: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 .....	25
Abbildung 3: Extinktionsverlauf von Poly-DL-Lysin.....	26
Abbildung 4: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 150 000-300 000 .....	27
Abbildung 5:Extinktionsverlauf von Poly-Lysin Tyrosin 1:1 .....	28
Abbildung 6: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Tyrosin.....	29
Abbildung 7: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Alanin 1:1 .....	30
Abbildung 8: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Alanin 3:1 .....	31
Abbildung 9: Extinktionsverlauf von Poly-Lysin-Alanin .....	32
Abbildung 10: Extinktionsverlauf von von Poly-L-Lysin 1000-4000 mit Immunkomplexzugabe.....	34
Abbildung 11: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 1000-4000 ohne Immunkomplexzugabe .....	34
Abbildung 12 Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 ohne Immunkomplexzugabe .....	36
Abbildung 13. Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 mit Immunkomplexzugabe.....	36
Abbildung 14: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 ohne Immunkomplexzugabe .....	38
Abbildung 15: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin 15000-30000 mit Immunkomplexzugabe.....	38
Abbildung 16: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 ohne Immunkomplexzugabe .....	40
Abbildung 17: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 1:1 mit Immunkomplexzugabe .....	40
Abbildung 18: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 5000-15000 ohne Immunkomplexzugabe .....	42
Abbildung 19: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin-Alanin 5000-15000 mit Immunkomplexzugabe .....	42
Abbildung 20: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin.....	43
Abbildung 21: Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Tyrosin.....	44
Abbildung 22: Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Leucin .....	45
Abbildung 23: Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Leucin-Tyrosin .....	46
Abbildung 24: Extinktionsverlauf von Poly-Glutamin-Alanin 6:4 .....	47
Abbildung 25: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure .....	48
Abbildung 26: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure .....	49
Abbildung 27: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure .....	50
Abbildung 28: Extinktionsverlauf von Poly-L-Histidin.....	51
Abbildung 29: Extinktionsverlauf von Poly-L-Tyrosin .....	52
Abbildung 30: Extinktionsverlauf von Poly-Ornithin-Tyrosin .....	53
Abbildung 31: Extinktionsverlauf von L-Arginin mit und ohne Immunkomplexeinwirkung .....	55
Abbildung 32: Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin .....	56
Abbildung 33: Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparagin .....	57
Abbildung 34: Extinktionsverlauf von Poly-L-Prolin.....	58
Abbildung 35: Extinktionsverlauf von Poly-DL-Alanin.....	59
Abbildung 36: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glycin.....	60
Abbildung 37: Extinktionsverlauf von Poly-DL-Aspartat .....	61
Abbildung 38: Extinktionsverlauf von Poly-L-Tryptophan .....	62
Abbildung 39: Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparagin mit und ohne Immunkomplexeinwirkung.....	63
Abbildung 40: Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin .....	64
Abbildung 41: Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparagin .....	65
Abbildung 42: Extinktionsverlauf von Hydroxy-Prolin.....	66
Abbildung 43: Extinktionsverlauf von Poly-DL-Alanin.....	67
Abbildung 44: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glycin.....	68
Abbildung 45: Extinktionsverlauf von Poly-L-Asparaginsäure.....	69
Abbildung 46: Extinktionsverlauf von Poly-L-Tryptophan .....	70
Abbildung 47: Extinktionsverlauf von Poly-L-Arginin-Tyrosin 4:1 mit/ ohne Immunkomplexeinwirkung.....	71
Abbildung 48: Extinktionsverlauf von Poly-DL-Alanin.....	72
Abbildung 49: Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin .....	73
Abbildung 50: Extinktionsverlauf von Poly-L-Ornithin .....	74
Abbildung 51: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin-Tyrosin .....	75
Abbildung 52: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin.....	76
Abbildung 53: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin.....	77
Abbildung 54: Extinktionsverlauf von Poly-L-Lysin.....	78
Abbildung 55: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutamin-Alanin .....	79
Abbildung 56: Extinktionsverlauf von Poly-L-Tyrosin .....	80
Abbildung 57: Extinktionsverlauf von Poly-L-Glutaminsäure .....	81



## 10 Abkürzungsverzeichnis

APC	=	antigenpräsentierende Zellen
Abb.	=	Abbildung
Best.-Nr.	=	Bestellnummer
bzw.	=	beziehungsweise
c	=	Konzentration
Ca <sup>2+</sup>	=	Calcium-Ionen
CaCl <sub>2</sub>	=	Calciumchlorid
cm	=	Zentimeter
d	=	Tage
dl	=	Deziliter
E	=	Extinktion
ELAM	=	endothel like adhesions molecule
Fa.	=	Firma
g	=	Gramm
GA	=	Glutaraldehyd
h	=	Stunden
H <sub>2</sub> O	=	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Wasserstoffperoxid
HCL	=	Salzsäure
IC	=	Immunkomplexe
ICAM	=	intracellular adhesions molecule
Ig	=	Immunglobulin
IL	=	Interleukin
l	=	Liter
LDL	=	low density lipoprotein
M	=	molar
M.	=	Morbus
Mg	=	Milligramm
Mg <sub>2+</sub>	=	Magnesiumionen
MgCl <sub>2</sub>	=	Magnesiumchlorid
MHC	=	Major Histocompatibility Complex
ml	=	Milliliter

mm	=	Millimeter
mmol	=	millimolar
MW	=	Mittelwert
NaCl	=	Natriumchlorid
NHS	=	Normales Humanserum
nm	=	Nanometer
NO	=	Stickoxid
O <sub>2</sub>	=	Sauerstoff
o.g.	=	oben genannt
PAF	=	Plättchenaktivierungsfaktor
PDGF	=	platelet-derived growth factor
PEG	=	Polyethylenglykol
S.	=	Seite
s.u.	=	siehe unten
t	=	Zeit
Tab.	=	Tabelle
TNF	=	Tumornekrosefaktor
u.U.	=	unter Umständen
v.a.	=	vor allem
VCAM	=	vascular cell adhesion molecule
vgl.	=	vergleiche
VLDL	=	very low density lipoproteins
z.B.	=	zum Beispiel
µl	=	Mikroliter
°C	=	Grad Celsius

## **11 Anhang**

### **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe und den aufmunternden Beistand vieler Menschen entstanden. Stellvertretend für sie möchte ich folgenden Personen ganz besonders danken:

#### **Herrn Prof. Dr. med. R. Hartung**

für die Möglichkeit, auf dem grundlegenden und interessanten Gebiet der Plasmadestabilisierung forschen und promovieren zu dürfen. Besonders bedanke ich mich für die gastweise Überlassung des urologischen Forschungslabors im Klinikum r.d.I. und für die großzügige Ausstattung mit Material und Gerätschaften.

#### **Herrn Dr. P. Leskovar**

für die intensive Betreuung während der Versuchsphase und bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.

#### **Frau Monika Moissl**

für die kompetente und verständnisvolle Beantwortung aller labortechnischen Fragen.

#### **Thomas Stock**

für die gemeinsam im Labor verbrachte Zeit und die dabei immer wieder erlebte und genossene, hervorragende Zusammenarbeit.

#### **Johannes Gleiß**

für Geduld, Ansporn und Mithilfe beim Lesen der Korrekturen.

Last not least danke ich herzlich

**meiner Schwester Barbara**, **meiner Freundin Stephanie Zabel**, und **meinen Eltern** sowie Herrn Ralf Schmidmaier für ihre immer wieder aufmunternden Gespräche und motivierenden Denkanstöße. Ihre Anteilnahme hat entschieden zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

München, Dezember 2002

(Christian Lorz)