

Urologische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

Plasmadestabilisierung durch die Interaktion von
cholesterolhaltigen Vesikeln mit einigen Plasmakomponenten
in An- und Abwesenheit von zirkulierenden Immunkomplexen

Thomas Stock

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 07.05.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | Modifizierung von Lipoproteinen und Bildung von LDL-enthaltenden Immunkomplexen | 5 |
| 1.2 | Immunantwort auf modifizierte Lipoproteine – Makrophagenstimulation und Th1/Th2-Balance | 8 |
| 1.3 | Atherosklerose als Modell einer chronisch entzündlichen Erkrankung | 11 |
| 2 | Material und Methoden | 15 |
| 2.1 | Mess- und Arbeitsgeräte | 15 |
| 2.1.1 | Photometer | 15 |
| 2.1.2 | pH-Meter | 15 |
| 2.1.3 | Waage | 15 |
| 2.2 | Verwendete Labor-Diagnostika | 15 |
| 2.2.1 | Monotest Cholesterin | 15 |
| 2.2.2 | Modifikation der Standardmeßmethode | 16 |
| 2.2.3 | Präzisionskontrolle Monotest Cholesterin | 17 |
| 2.3 | Reagenzien | 18 |
| 2.3.1 | Essentielle Bestandteile des Versuchssystems | 18 |
| 2.3.2 | Applizierte Substanzen | 19 |
| 2.4 | Versuchsaufbau | 20 |
| 2.4.1 | Messparameter und Nachweismethoden | 20 |
| 2.4.2 | Auswertung der Resultate | 21 |
| 3 | Messergebnisse | 22 |
| 3.1 | Bestimmung der Reverenzwerte – Extinktionsänderung ohne Zugabe von Testsubstanzen | 22 |
| 3.2 | Pipettierschema für die Versuche 1 – 21 | 24 |
| 3.3 | Darstellung der Ergebnisse der Versuche 1 – 21 | 25 |
| 3.4 | Einfluss, der stark basischen Aminosäure Arginin in verschiedenen Polypeptidgrößen sowie in heteropolymeren Polypeptidketten mit den Aminosäuren Serin, Tryptophan und Tyrosin auf die Stabilität von Serumcholesterin | 26 |
| 3.4.1 | Versuch 1: Poly-L-Arginin 5 000 - 15 000 | 27 |
| 3.4.2 | Versuch 2: Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 | 29 |
| 3.4.3 | Versuch 3: Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 | 31 |
| 3.4.4 | Versuch 4: Poly (Arg, Ser) 3:1 | 33 |
| 3.4.5 | Versuch 5: Poly (Arg, Trp) 4:1 | 35 |
| 3.4.6 | Versuch 6: Poly (Arg, Tyr) | 37 |
| 3.4.7 | Ergebnisse der Untersuchungen mit der basischen Aminosäure Arginin | 39 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.5 | Einfluss der sauren Aminosäure Asparaginsäure in verschiedenen Polypeptidgrößen und bei unterschiedlicher Chiralität auf die Stabilität von Serumcholesterin | 40 |
| 3.5.1 | Versuch 7: Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 | 41 |
| 3.5.2 | Versuch 8: Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 | 43 |
| 3.5.3 | Versuch 9: Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000..... | 45 |
| 3.5.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 47 |
| 3.6 | Untersuchungen zur Plasmadestabilisierung durch verschiedene Enantiomere der Aminosäure Homocystein sowie seines Thioesters Homocystein-Thiolacton..... | 48 |
| 3.6.1 | Versuch 10: DL-Homocystein | 49 |
| 3.6.2 | Versuch 11: L-Homocystein | 51 |
| 3.6.3 | Versuch 12: D-Homocystein-Thiolacton..... | 53 |
| 3.6.4 | Versuch 13: L-Homocystein-Thiolacton | 55 |
| 3.6.5 | Beschreibung der Ergebnisse | 57 |
| 3.7 | Untersuchungen zur Plasmadestabilisierung durch Poly-L-Ornithin in verschiedenen Molekülgrößen | 58 |
| 3.7.1 | Versuch 14: Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 | 59 |
| 3.7.2 | Versuch 15: Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000 | 61 |
| 3.7.3 | Versuch 16: Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000 | 63 |
| 3.7.4 | Beschreibung der Ergebnisse | 65 |
| 3.8 | Untersuchungen zum Verhalten cholesterinhaltiger Plasmabestandteile in Interaktion mit den Substanzen Glycin, Hydroxyprolin, Tryptophan, Lysozym und Glutamin..... | 66 |
| 3.8.1 | Versuch 17: Poly-Glycin 2 000 - 5 000..... | 68 |
| 3.8.2 | Versuch 18: Poly-L-Hydroxyprolin 5 000 - 20 000 | 70 |
| 3.8.3 | Versuch 19: Poly-DL-Tryptophan 5 000 - 15 000..... | 72 |
| 3.8.4 | Versuch 20: Lysozym..... | 74 |
| 3.8.5 | Versuch 21: Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000 | 76 |
| 3.8.6 | Beschreibung der Ergebnisse | 78 |
| 3.9 | Resuspensionsversuche mit Poly (Arg, Trp) 4:1 als Grundsubstanz | 79 |
| 3.9.1 | Versuch 22: Poly-DL-Alanin 1 000 - 5 000 | 81 |
| 3.9.2 | Versuch 23: Poly-Glycin 2 000 - 5 000..... | 83 |
| 3.9.3 | Versuch 24: Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 | 85 |
| 3.9.4 | Versuch 25: Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 | 87 |
| 3.9.5 | Versuch 26: Poly-L-Glutaminsäure 2 000 - 15 000..... | 89 |
| 3.9.6 | Versuch 27: Poly-L-Glutaminsäure 750 - 1500 | 91 |
| 3.9.7 | Versuch 28: Poly (Glu, Ala) 6:4 | 93 |
| 3.9.8 | Versuch 29: Poly-L-Tyrosin | 95 |
| 3.9.9 | Versuch 30: Poly-L-Glutaminsäure 3 000 - 15 000 | 97 |
| 4 | Diskussion..... | 99 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 106 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 108 |

| | | |
|----|-----------------------------|-----|
| 7 | Tabellenverzeichnis..... | 114 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis..... | 118 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 122 |
| 10 | Danksagung..... | 123 |
| 11 | Lebenslauf..... | 124 |

1 Einleitung

1.1 Modifizierung von Lipoproteinen und Bildung von LDL-enhaltenden Immunkomplexen

Lipoproteine sind in vivo verschiedenen Veränderungen unterworfen. Im Plasma von Diabetes-Patienten wurden glykosylierte LDL (glyLDL) nachgewiesen (12, 46). Des Weiteren konnten in normalen Individuen und in atherosklerotischen Läsionen sowohl durch Malondialdehyd veränderte LDL (MDA-LDL), als auch oxidierte LDL (oxLDL) gefunden werden (5).

Während für die Atherogenität von oxLDL starke Belege vorliegen, ist nicht klar, ob glyLDL in gleicher Weise pathogenetisches Potential besitzen (31). Mit glyLDL exponierte Makrophagen zeigen erhöhte Akkumulation von Cholesterolestern (30), wobei die Aufnahme von glyLDL direkt proportional dem Grad der Glykosylierung (33) ist und nicht über Scavenger-Rezeptoren vermittelt wird, sondern über einen Rezeptor geringerer Affinität und höherer Kapazität (30). Ein Hinweis auf die Atherogenität von glyLDL ist die Tatsache, dass sie die Freisetzung von freien Radikalen erhöhen, was wiederum zu erhöhter Oxidation von LDL führt. Die Glykosylierung führt aber nicht nur zu höherer Empfänglichkeit von LDL für oxidative Prozesse, sondern erhöht auch die Neigung der in der Gefäßwand befindlichen Strukturproteine, LDL zu binden und trägt so zu deren erhöhter oxidativer Modifizierung bei (37).

Die Oxidation von LDL-Partikeln ist ein komplexer Prozess, der sich sowohl im Extra- wie auch im Intrazellulärraum abspielt und an dessen Ende ein modifiziertes LDL mit erhöhter Immunogenität steht (51).

Ein LDL-Partikel durchschnittlicher Größe enthält ungefähr 700 Phospholipid-Moleküle, 600 Moleküle freies Cholesterol, 1600 Cholesterolester-Moleküle, 185 Triglyceridmoleküle und ein Molekül Apoprotein B (ApoB), das wiederum aus 4536 Aminosäuren besteht. Sowohl die Lipide als auch das ApoB können oxidiert werden. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Cholesterolestern, Phospholipiden und Triglyceriden werden durch freie Radikale oxidiert und beschleunigen die Kettenreaktion und damit das Ausmaß der Oxidation (50).

Ein Schlüsselereignis der LDL-Oxidation ist das Auseinanderbrechen der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, was eine hohe Anzahl kleinerer Fragmente mit der Länge von 3-9 Kohlenstoff hervorbringt, einschließlich Aldehyden und Ketonen, die zu anderen Lipiden oder

ApoB konjugieren können (50). Z.B. kann Malondialdehyd, das während der Oxidation gebildet wird, Schiff-Basen mit den ϵ -Aminogruppen von Lysinresten bilden und Querverbindungen zwischen Lipiden und Proteinen herstellen. Während der Oxidation von LDL bis zu einer Form, die von Scavenger-Rezeptoren erkannt wird, sind 40-50% der reaktiven Lysin- ϵ -Aminogruppen maskiert (50).

Wenn mehrfach ungesättigte Fettsäuren von Phospholipiden und Cholesterolestern in den Lipoproteinkernen oxidiert werden, entstehen hochreaktive Zwischenprodukte wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (8). Diese bilden dann kovalente Bindungen mit Lysin- und Histidinresten von Apoprotein B oder anderen eng assoziierten Proteinen. In Analogie dazu bilden Aldehydgruppen von modifizierten Fettsäure-Fragmenten, die noch an die Phospholipide gebunden sind, Bindungen mit Proteinen oder anderen Phospholipiden. Auf diese Weise entsteht eine große Anzahl von oxidierten Lipid/Phospholipid-Protein-Bindungen und oxidierten Lipid-Lipid-Bindungen (40).

Man nimmt an, dass modifizierte Lipoproteine auch über einen anderen Mechanismus zur Atherogenese beitragen: ihre Fähigkeit, eine Immunantwort auszulösen, die zur Produktion von Antikörpern und darauf folgend zur Formierung von Immunkomplexen führt (36).

Durch Modifizierung von Lysin- und Histidinresten entstandene spezifische Epitope wirken immunogetisch, und dabei ist es unerheblich, ob die Modifizierung aus einer Reaktion mit Lipid-Peroxidations-Produkten oder aus anderen Prozessen wie nicht-enzymatische Glykosilierung resultiert. Studien mit metylierten und glykosilierten LDL indizieren, dass selbst geringe Modifizierungen von Lysinresten eine starke humorale Immunantwort auslösen (2, 14). Diese drückt sich in einer starken Bildung von Antikörpern gegen diese neu entstandenen Epitope aus.

Gegen oxidierte LDL (oxLDL) gerichtete Antikörper (IgoxLDL) finden sich sowohl im zirkulierenden Blut als auch in atheromatösen Plaques (44). Sie werden neben der Atherosklerose auch bei vielen anderen Krankheiten gefunden wie Diabetes mellitus, renovaskuläres Syndrom und Urämie. Auch Rauchen zusammen mit Hypercholesterinämie erhöht den IgoxLDL-Titer (16). Primär chronische Polyarthrit, rheumatisches Fieber, Morbus Bechterew oder Lupus erythematodes sind weitere Krankheiten, die oft mit erhöhten IgoxLDL-Spiegeln verbunden sind (45).

Es wurde berichtet, dass erhöhte Autoantikörper-Spiegel gegen oxidierte LDL den atherosklerotischen Prozess beschleunigen könnten. Prospektive Studien mit Individuen ohne autoimmunologische Erkrankungen haben gezeigt, dass erhöhte IgoxLDL-Spiegel eine Progression der Atherosklerose der Karotis und des Myokardinfarktes voraussagen konnte. Diese Untersuchungen legen nahe, dass erhöhte Spiegel von Antikörpern gegen oxidierte LDL in Menschen in einer engen Relation mit dem atherosklerotischen Prozess in der Gefäßwand stehen. In vitro-Studien haben gezeigt, dass IgoxLDL die Aufnahme und Akkumulation von LDL in Makrophagen über einen Fc-Rezeptor-vermittelten Mechanismus erhöhen (55).

Das Vorhandensein solcher Antikörper und oxLDL führt zur spontanen Bildung von LDL-enthaltenden Immunkomplexen (LDL-IC) (4). Die Inkubation von Makrophagen mit LDL-IC in vitro führt zu massiver Cholesterin-Ester-Akkumulation und zur Schaumzellbildung (13).

Studien von Tertov (52, 53) und Orekhov (39) unterstützen die pathogenetische Rolle von LDL-IC in vivo. Sie zeigten, dass in den Seren von KHK-Patienten höhere Konzentrationen von LDL-IC vorkommen als in normalen Individuen und dass der Cholesterin-Gehalt von LDL-IC ein starker Vorhersagewert für das Auftreten einer KHK ist. LDL-IC sind damit als wichtiger pathogenetischer Faktor für die Entwicklung der Atherosklerose bei Diabetes mellitus-Patienten anzusehen (36).

1.2 Immunantwort auf modifizierte Lipoproteine – Makrophagenstimulation und Th1/Th2-Balance

Obwohl generell anerkannt wird, dass das Immunsystem sowohl am Beginn als auch am Fortschreiten der Atherosklerose aktiv beteiligt ist, wird die Rolle der verschiedenen Zellen, Antikörper, Lymphokine und anderer zirkulierender Proteine am Prozess der Atherombildung kaum verstanden (27, 43). In jüngster Zeit haben sich Daten angesammelt, die nahe legen, dass eine Autoimmun-Antwort, verursacht durch modifizierte LDL und Bildung von Immunkomplexen, ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der Atherosklerose ist (29). Humane Monozyten erfüllen verschiedene Funktionen wie Phagozytose, Antigen-Prozessierung und Präsentation an Immunzellen, Sekretion einer großen Zahl bioaktiver Produkte mit signifikanten Rollen in Immun- und Entzündungsreaktionen. Außerdem haben sie die Fähigkeit, durch eine Anzahl verschiedener Mechanismen, einschließlich antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität, Tumorzellen und andere abnorme Zellen zu töten (13).

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von atheromatösen Läsionen (11, 42). Die Ingestion von LDL-IC durch Makrophagen führt nicht nur zur Schaumzellbildung, sondern induziert auch die Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) (7, 17). TNF α und IL-1 β können die Expression von Zelladhäsions-Molekülen (CAMs) durch Endothelzellen erhöhen. TNF α wirkt außerdem als chemotaktischer Faktor und hat dadurch das Potential, eine sehr wichtige Rolle bei der Progression des atherosklerotischen Prozesses zu spielen. IL-1 β kann zusätzlich zur Entwicklung der atheromatösen Läsion beitragen, indem es, direkt oder indirekt, die Proliferation von glatten Muskelzellen fördert. Aktivierte Makrophagen entlassen auch aktive Sauerstoffradikale, die an der Oxidation von LDL im subendothelialen Kompartiment beteiligt sein könnten (57).

Die Kapazität von IL-1 β und TNF α , die Expression von CAM (cell adhesion molecules) durch Endothelzellen hochzuregulieren ist dahingehend interessant, dass damit zwar nicht die initiale Migration von Monozyten in den Subendothelialraum erklärt werden kann, sehr wohl aber die Progression der Läsion, wenn man davon ausgeht, dass die subendothelialen Makrophagen aktiviert sind und dadurch verschiedene Zytokine freisetzen. Zusätzlich zur Erhöhung der CAM-Expression hat die Freisetzung von Zytokinen in den subendothelialen Raum einige weitere Konsequenzen, die eine pathogenetische Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose

spielen könnten: Stimulation von Zellproliferation, Chemotaxis für Monozyten und Fixierung von Monozyten im Subendothelialraum durch Interaktionen mit glatten Muskelzellen (57).

Modifizierte LDL werden überwiegend über Scavenger-Rezeptoren in Makrophagen aufgenommen (4). Der wesentliche Unterschied der LDL-Aufnahme via Scavenger-Rezeptor gegenüber LDL-Rezeptor ist, dass der LDL-Rezeptor durch negative Rückkopplungsmechanismen auf Cholesterinbiosynthese und Rezeptorexpression saturierbar ist, der Scavenger-Rezeptor dagegen nicht. Somit kommt es bei hohem Angebot von modifizierten LDL zur unkontrollierten Aufnahme von LDL-Partikeln und zur Lipidüberladung des Makrophagen, was die Bildung von Schaumzellen zur Folge hat (31).

Einer der effektivsten Mechanismen zur Schaumzellbildung *in vitro* scheint aber die Inkubation von humanen (monocyte-derived) Makrophagen mit LDL-enthaltenden Immunkomplexen (LDL-IC) zu sein. Die Aufnahme der LDL-IC geschieht überwiegend über Fc γ -Rezeptoren und geht mit einer allgemeinen Aktivierung des Makrophagen einher (57). *In vitro*-Inkubation von Makrophagen mit LDL-ICs führte zu massiver CE-Akkumulation und Schaumzellbildung. Außerdem konnte gezeigt werden, dass massive CE-Akkumulation in Makrophagen sowohl durch unlösliche als auch durch lösliche LDL-ICs induziert werden kann, nach Adsorption an autologe Erythrozyten (31).

Zusammen mit Makrophagen infiltrieren bei der Entstehung der Atherosklerose auch T-Lymphozyten zu einem frühen Zeitpunkt die Intima der Gefäßwand, die dann, je nach den dort vorhandenen Zytokinen zu Th1- oder Th2-Zellen differenzieren. IL-12, das von aktivierten Makrophagen sezerniert wird, fördert dabei die Differenzierung zu Th1-Zellen, während IL-10 diesen Weg inhibiert und die Differenzierung zu Th2-Zellen fördert. Die Hypothese, dass bei der Entstehung der Atherosklerose der Th1-Pathway überwiegt, wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in atherosklerotischen Veränderungen IL-12, ein Th1-Induktor, gegenüber IL-10, das die Th1-Antwort unterdrückt, überwiegt (10).

Nach Aktivierung sezernieren Th1-Zellen die pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin (LT, TNF- β). Diese aktivieren Makrophagen zur Produktion von ROI (reactive oxygen intermediates) und von NO (nitric oxide), stimulieren ihre phagozytische Funktion und verstärken ihre Fähigkeit zur Antigen-Präsentation durch die Hochregulation von MHC-Klasse-II-Molekülen. Th2-Zellen produzieren dagegen die antiinflammatorischen

Zytokine IL-4 und IL-5 und stellen potente Hilfe bereit für die B-Zell-Aktivierung. Sie mildern die allergische Immunantwort und sind mit der Downregulation von Makrophagen assoziiert, was größtenteils durch den anti-inflammatorischen Effekt von IL-4 vermittelt wird (47).

Es konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede der Subpopulationen von Th-Zellen nicht von der Zelllinie vorbestimmt sind, sondern dass sie sich aus der gleichen unabhängigen Precursor-Zelle unter dem Einfluss von Umwelt und genetischen Faktoren entwickeln. Die wichtigsten Regulatoren zur Differenzierung der Subpopulationen sind dabei Zytokine. Während das Auftreten von IL-4 CD4⁺ T-Zellen zur Differenzierung in Th2-Lymphozyten anregt, entwickeln sie sich in Abwesenheit von IL-4 und, als größten Induktor, bei Vorkommen von IL-12 in Th1-Lymphozyten (47).

Th1- und Th2-Zellen antagonisieren sich gegenseitig, indem sie gegenseitig ihre Effektorfunktionen blockieren. Z.B. wird die Entwicklung von Th1-Zellen effektiv durch hohe Konzentrationen von IL-4 blockiert, auch in Anwesenheit von IL-12. Außerdem antagonisiert IL-4, das Kennzytokin von Th2-Zellen, den pro-inflammatorischen Effekt von IFN- γ zu großen Teilen und inhibiert die Proliferation von Th1-Zellen. Andererseits blockiert IFN- γ , das von aktivierten Th1-Zellen sezerniert wird, die Proliferation von Th2-Zellen (47).

Die Produktion von IFN- γ ist das Kennzeichen von Th1-Zellen. IFN- γ wird hauptsächlich von aktivierten Th-Lymphozyten und NK-Zellen produziert und hat Rezeptoren auf nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers. Daher erfüllt es eine große Anzahl biologischer Funktionen. Die Fähigkeit zur Aktivierung von Endothelzellen und von Makrophagen ist die Grundlage dafür, dass IFN- γ als pro-inflammatorisches Zytokin definiert wird. IFN- γ erhöht die Expression von Fc γ -Rezeptoren bei Makrophagen, was nach Anbinden von Immunglobulinen deren phagozytotische Funktion erhöht. Bei Endothelzellen erhöht IFN- γ die Expression von dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), das das Anheften von Lymphozyten verstärkt (47).

1.3 Atherosklerose als Modell einer chronisch entzündlichen Erkrankung

Am Beginn einer atheromatösen Plaque steht nach heutigem Stand der „Response-to-injury“-Hypothese eine endotheliale Dysfunktion, verursacht durch modifizierte LDL, Hypertonus, Diabetes mellitus, erhöhtem Plasma-Homocysteinspiegel und infektiöse Mikroorganismen wie Herpesviren oder Chlamydia pneumoniae (41). Diese endotheliale Dysfunktion hat eine entzündliche Reaktion in der Gefäßwand zur Folge, die durch Makrophagen und spezifische Subtypen von T-Lymphozyten vermittelt wird (22, 56).

Endothelzellen reagieren sehr sensibel auf physikalische (Scherkräfte bei Hypertonie), chemische (Hypercholesterinämie) und endokrine Reize (Kohlenhydratstoffwechsel, Steroidhormonstoffwechsel) und stellen ihren Stoffwechsel und Aktivierungsgrad auf diese Veränderungen ein. Früh nach Initiation einer atherogenen Diät beginnen jedoch einige Endothelzellen, an ihrer Oberfläche selektive Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, an die verschiedene Leukozyten-Klassen binden (28). Im besonderen binden genau diejenigen Leukozyten an den exprimierten VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), die bei frühen atheromatösen Veränderungen gefunden werden: Monozyten und T-Lymphozyten (25). Einmal am Endothel angehaftet, penetrieren die Leukozyten in die Intima, wofür wiederum verschiedene chemotaktische Moleküle, z.B. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) im Falle der Monozyten, verantwortlich sind (28). Nach dem Eindringen in die Intima führt die Aktivierung dieser Zellen zur Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die die Entzündungsreaktion weiter antreiben (26). Und in der Tat ist die erste Veränderung in der Gefäßwand, der fatty streak, eine rein entzündliche Läsion, die lediglich aus Lipid-beladenen Makrophagen und T-Lymphozyten besteht (49).

Monozyten, die Vorgängerzellen von Makrophagen, sind in jeder Phase der Atherogenese anwesend. Aus Monozyten gereifte Makrophagen sind nicht nur Fresszellen, sondern auch antigenpräsentierende Zellen und sie sezernieren auch Zytokine, Chemokine, Wachstumsregulatoren, Metalloproteinasen und andere hydrolytische Enzyme (41).

Neben diesen Funktionen sind Makrophagen aber auch immunkompetente Zellen und eine ihrer Hauptfunktionen ist die Präsentation von Antigenen. Durch Phagozytose oder – in Form von Immunkomplexen – über Fc-Rezeptoren aufgenommene modifizierte LDL werden prozessiert und den T-Zellen zusammen mit MHC-Klasse I oder II präsentiert. Dies erhöht in hohem Maße die T-Zell-Stimulation und die darauf folgende Immunantwort (1). Aktivierte T-

Zellen sezernieren Zytokine wie Interferon- γ und TNF α und β , die die inflammatorische Antwort noch ausweiten (41).

Ein mögliches Antigen, das durch Makrophagen prozessiert und anschließend präsentiert wird, ist oxLDL (41). Vermutlich unterhalten Makrophagen die Immunreaktion sogar dadurch, dass sie selbst zur Oxidation von LDL beitragen, indem sie freie Radikale produzieren, oder auch über den Myeloperoxidase-Weg (15).

Oxidiertes LDL (oxLDL) wirkt sowohl auf Monozyten als auch auf T-Zellen chemotaktisch (40), beeinflusst die Genregulation von vaskulären Zellen und fördert die Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM-1) und chemotaktischen Proteinen (z.B. MCP-1) durch Endothelzellen (34).

Zusätzlich zu oxLDL erscheinen in der Gefäßwand viele andere Antigene, die eine Immunantwort auslösen könnten. So kommen bei Diabetikern sogenannte AGEs (advanced glycation end-products) vor (32). Eine weitere Antigen-Quelle könnten Heat-Shock-Proteine (HSPs) sein (60). Schließlich könnten die Antigene auch aus bakteriellen oder viralen Infektionen resultieren (40).

Auch erhöhte Konzentrationen von freiem und proteingebundenem Homocystein sind mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko verbunden (23) und die Hyperhomocysteinämie ist neben den schon lange bekannten Risikofaktoren Zigarettenrauchen, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie als unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose nachgewiesen worden (58).

Homocystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die innerhalb des Methioninmetabolismus gebildet wird und entweder durch Remethylierung oder Transsulfurierung metabolisiert wird (58). Die Remethylierung von Homocystein wird durch das Enzym Methionin-Synthase katalysiert, wobei Vitamin B₁₂ (Cobalamin) essentieller Cofaktor ist und die Methylgruppe von N⁵-methyl-tetrahydrofolat stammt (54). Falls Methionin im Überschuss vorhanden ist oder im Stoffwechsel Cystein benötigt wird, tritt Homocystein in den Transsulfurierungsweg ein, in dem es zusammen mit Serin, katalysiert von dem Vitamin B₆-abhängigen Enzym Cystathionin- β -Synthase, Cystathionin bildet (54), das zu Cystein weiter hydrolysiert wird (9).

Erhöhte Plasma-Homocystein-Spiegel sind typischerweise auf genetische Defekte der beteiligten Enzyme oder auf ernährungsbedingten Mangel der Cofaktoren zurückzuführen (58). Merklich erhöhte Homocystein-Spiegel wurden bei Patienten mit ernährungsbedingtem Mangel an dem essentiellen Cofaktor Vitamin B₁₂ (3) und dem Cosubstrat Folsäure (24, 48) beobachtet. Aber auch einige andere Faktoren beeinflussen die Konzentration von Homocystein im Plasma. So steigt der Homocysteinspiegel mit der Erhöhung von Creatinin an und ist typischerweise bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz erhöht (6, 59). Auch im Zusammenhang mit einigen Karzinomen wie Mammakarzinom, Ovarialkarzinom und Pankreaskarzinom wurde von erhöhten Homocysteinspiegeln berichtet (35). Und auch verschiedene Medikamente oder Toxine erhöhen die Plasma-Homocystein-Konzentration (58).

Einige Daten legen nahe, dass die schädigende Wirkung von Homocystein gegenüber menschlichen Zellen auf seine metabolische Konversion zu Homocystein-Thiolacton, einem reaktiven Thioester, zurückzuführen sei. Diese Konversion kommt in allen menschlichen Zellarten, auch in Endothelzellen, vor und wird durch die Methionyl-tRNA-Synthetase (MetRS) katalysiert. Dieser Mechanismus der Homocystein-Thiolacton-Synthese beinhaltet eine zwei-Schritt-Reaktion, die durch die Hydrolyse von ATP angetrieben wird. Wird die Methionin-Synthase-Aktivität durch Folsäure- oder Vitamin-B₁₂-Mangel inhibiert, so wird beinahe das gesamte vorhandene Homocystein durch die MetRS zu Homocystein-Thiolacton konvertiert (19).

Homocystein-Thiolacton reagiert auf unterschiedliche Weisen: Homocysteinisierung von Proteinen (20), Bindung an LDL oder enzymatische Hydrolyse zu Homocystein durch die Calcium-abhängige Homocystein-Thiolactonase, eine Komponente des HDL (19).

Proteine können durch Homocystein-Thiolacton unter physiologischen Bedingungen leicht homocysteinisiert werden (20). An den Seitenketten der Aminogruppen in Proteinen sind Lysinreste die wesentlichen Stellen der Homocysteinisierung (20). Diese Homocysteinisierung von Proteinen führt zu einer Schädigung des Proteins und damit zu einem Wirkungsverlust, z.B. wird Trypsin durch Homocysteinisierung inaktiviert, und auch die Lysin-Oxidase, ein wichtiges Enzym, verantwortlich für die posttranslationale Modifizierung und essentiell für die Biogenese der Bindegewebs-Matrix, wird durch Homocystein-Thiolacton irreversibel inaktiviert (19). Durch die Homocysteinisierung werden in das Protein auch zusätzliche SH-Gruppen eingebaut und die spontane Oxidation dieser Thiole kann zur Bildung von intermole-

kularen Disulfidbrücken und zur Formation von Protein-Multimeren führen, was sich anhand von Cytochrom c nachweisen ließ: Die Homocysteinisierung von Cytochrom c mit ansteigenden Konzentrationen von Thiolacton führte zur Bildung von Cytochrom-c-Dimeren, -Trimeren, -Tetrameren etc. (20).

Homocystein-Thiolacton, ein hoch reaktives anhydriertes Nebenprodukt der Homocystein-Oxidation, bildet mit LDL Aggregate, die von Makrophagen in der Intima der Gefäßwand aufgenommen und während der Schaumzellbildung in die entstehende atheromatöse Plaque eingebaut werden (38).

Da die Homocystein-Thiolactonase eine eng gebundene Komponente des HDL ist (18), war zu erwarten, dass HDL die Akkumulation von Homocystein-Thiolacton vermindert, was sich auch in Versuchen mit HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) bestätigen ließ (21). Diese enge Verbindung von Homocystein-Thiolactonase mit HDL könnte einen Teil der Schutzfunktion des HDL im menschlichen Gefäßsystem erklären (19).

2 Material und Methoden

2.1 Mess- und Arbeitsgeräte

2.1.1 Photometer

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

2.1.2 pH-Meter

Um die gewünschten pH-Werte zu erreichen, wurde das Milieu der Versuchsansätze mit Hilfe des Präzisions-pH-Meters E 510 der Firma Metrohm (Herisau, Schweiz) eingestellt.

2.1.3 Waage

Zur Herstellung der Polypeptidlösungen bestimmter Konzentration wurde für das Abwiegen der Substanzen eine Präzisionswaage der Firma Mettman (Typ AT 250, Schweiz) verwendet.

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

2.2 Verwendete Labor-Diagnostika

2.2.1 Monotest Cholesterin

Der Monotest Cholesterin (Firma Böhringer Mannheim GmbH, Produkt Nr. 237574) ist ein enzymatischer Farbttest zur Bestimmung von Serumcholesterin nach der CHOD-PAP-Methode.

Zunächst wird die dem Test beigefügte Cholesterin-Reagenzlösung mit 100 ml Aqua destillata rekonstruiert. Die Reagenzlösung ist nach 10 Minuten gebrauchsfertig und bei einer Temperatur von 2 - 8°C vier Wochen haltbar. Als Leerwert dienen 2,0 ml der Reagenzlösung, in

eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke pipettiert. Auch die Proben enthalten 2,0 ml Reagenzlösung, denen anschließend 20 µl des Probenmaterials beigemischt werden.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (bei Raumtemperatur) erfolgt die photometrische Bestimmung der Extinktionswerte. Die Messung sollte innerhalb einer Stunde bei einer Wellenlänge von 500 nm vorgenommen werden.

Die Konzentration des Cholesterins in der Probe berechnet sich aus folgender Formel:

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

Die Berechnungsformel gilt für Messungen bei 500 nm.

2.2.2 Modifikation der Standardmeßmethode

Aus Gründen der Kostendämpfung und zur Durchführung größerer Messreihen wurde der Monotest Cholesterin für unsere Zwecke dahingehend umgewandelt, dass wir in eine Lochplatte mit 96 wells je well ein Probenvolumen von 5 µl einbrachten und dieses mit 300 µl des Nachweisreagenzes der Firma Böhringer inkubierten. Diese Änderung erlaubte uns, die Extinktionsmessung mit dem Lochplattenphotometer der Firma Molecular Device durchzuführen und damit bei geringer Probenentnahme und geringem Reagenzienbedarf eine hohe Zahl von Messwerten zu erhalten.

Aufgrund der Geräteeigenschaften des Lochplattenphotometers konnten wir die Messungen nicht bei 500 nm Wellenlänge wie beim eigentlichen Monotest Cholesterin durchführen, sondern mussten auf eine Wellenlänge von 490 nm ausweichen.

Obwohl für die Auswertung unserer Versuche nur die Änderung der Extinktionswerte nötig waren, konnten wir in einer Präzisionskontrolle mit dem Testset Preciset der Firma Böhringer zeigen, dass die Messgenauigkeit der Methode auch für die Bestimmung der Absolutwerte ausreichen würde.

2.2.3 Präzisionskontrolle Monotest Cholesterin

Die Methode wurde mit Hilfe von Testlösungen genau definierter Cholesterinkonzentrationen (Preciset, Fa. Böhringer) überprüft.

| Sollwerte | Konzentr. (mg/dl) | P1 50 | P2 100 | P3 150 | P4 200 | P5 300 | P6 400 |
|----------------------------|----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| I | Extinktion | 0,081 | 0,167 | 0,259 | 0,367 | 0,500 | 0,716 |
| | Konzentr. (mg/dl) | 46,6 | 96,0 | 148,9 | 211,0 | 287,5 | 411,7 |
| II | Extinktion | 0,085 | 0,164 | 0,257 | 0,349 | 0,508 | 0,676 |
| | Konzentr. (mg/dl) | 48,9 | 94,3 | 147,8 | 200,7 | 292,1 | 388,7 |
| III | Extinktion | 0,086 | 0,167 | 0,262 | 0,335 | 0,516 | 0,671 |
| | Konzentr. (mg/dl) | 49,5 | 96,0 | 150,7 | 192,6 | 296,7 | 385,8 |
| IV | Extinktion | 0,088 | 0,169 | 0,253 | 0,343 | 0,495 | 0,697 |
| | Konzentr. (mg/dl) | 50,6 | 97,2 | 145,5 | 197,2 | 284,6 | 400,8 |
| V | Extinktion | 0,086 | 0,166 | 0,265 | 0,340 | 0,500 | 0,720 |
| | Konzentr. (mg/dl) | 49,5 | 95,5 | 152,4 | 195,5 | 287,5 | 414,0 |
| Mittelwerte | Extinktion | 0,085 | 0,167 | 0,259 | 0,347 | 0,504 | 0,696 |
| | Konzentr. (mg/dl) | 49,0 | 95,8 | 149,0 | 199,4 | 289,7 | 400,2 |
| Abweichung vom Sollwert | | 2,0% | 4,2% | 0,7% | 0,3% | 3,4% | 0,1% |

Tab. 1 Präzisionskontrolle des Monotests Cholesterin mit Preciset in Fünffachbestimmung (I, II, III, IV, V); P = Probe

Diese Nachweismethode erwies sich mit einer durchschnittlichen Sollabweichung von 1,8 % als geeignet.

Die Originalvorschrift des Testes wurde dann in Anbetracht der Tatsache, dass für unsere Fragestellung allein die Konzentrationsänderung und nicht die Absolutwerte des Serumcholesterins von Interesse waren, nochmals verändert.

Dazu wurde empirisch ein Volumenverhältnis zwischen Reagenzlösung und Probe ermittelt, bei dem sich die Extinktionen im Linearitätsbereich befanden.

Zu 3 µl Probe gab man 300 µl Reagenzlösung.

2.3 Reagenzien

2.3.1 Essentielle Bestandteile des Versuchssystems

2.3.1.1 Cholesterin

Aus verschiedenen zur Auswahl stehenden Substanzen wurde normales Humanserum (NHS) der Firma Sigma ausgewählt: Accutrol (Produkt-Nr. 2257).

Das NHS wird als Lyophilisat geliefert und sollte mit 20 ml Aqua dest rekonstruiert werden. Um es für unsere Versuche brauchbar zu machen, wurde es in 40 ml Aqua dest gelöst, was einer Verdünnung von 1:2 entsprach.

2.3.1.2 Immunkomplexe

Die in den Versuchen verwendeten Immunkomplexe wurden zum einen aus menschlichem Immunglobulin (Human-IgG der Firma Sigma, Produkt Nr. I - 4506) und zum anderen aus spezifischen Antikörpern gegen diese IgG (Anti-Human-IgG der Firma Sigma, Produkt Nr. I - 9384) hergestellt. Beide Lyophilisate wurden jeweils in einer Konzentration von 2 mg/ml in Aqua bidest eingewogen und im Verhältnis 1:1 gemischt.

Dass sich dabei Immunkomplexe bilden, wurde bereits im Rahmen früherer Dissertationen unserer Arbeitsgruppe mittels des ImmuSTRIP der Firma Medac GmbH (Produkt Nr. 10008) nachgewiesen.

2.3.1.3 Weitere Reagenzien

Als Grundmedium diente physiologische Kochsalzlösung, NaCl 0,9%.

Weitere Bestandteile nahezu aller Versuchssysteme waren zweifach positiv geladene Ionen, insbesondere Calcium und Magnesium in Form von Calciumchlorid und Magnesiumchlorid. Diese könnten nach unserer Auffassung eine Art „Brückenfunktion“ zwischen negativ geladenen Proteinen einnehmen.

Zur pH-Wert-Erniedrigung der Versuchsansätze wurde 0,1 M Salzsäure verwendet. Wir konnten dadurch das Probenmilieu auf pH-Werte zwischen drei und sieben einstellen.

2.3.2 Applizierte Substanzen

Die für die Versuche benötigten applizierten Reagenzien sind im Folgenden alphabetisch aufgelistet:

- Poly-DL-Alanin, Mol. Gew. 1 000 - 5 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 9003)
- Poly-L-Arginin, Mol. Gew. 5 000 - 15 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4663)
- Poly-L-Arginin, Mol. Gew. 15 000 - 70 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 7762)
- Poly-L-Arginin, Mol. Gew. 70 000 - 150 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 3892)
- Poly-L-Asparagin, Mol. Gew. 5 000 - 15 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 8137)
- Poly-L-Asparaginsäure, Mol. Gew. 15 000 - 50 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 6762)
- Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure, Mol. Gew. 2 000 - 10 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 3418)
- Poly- β -Benzyl-L-Aspartat, Mol. Gew. 50 000 - 100 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 2266)
- Poly (Arg, Ser) 3:1, Mol. Gew. 20 000 - 50 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 0286)
- Poly (Arg, Trp) 4:1, Mol. Gew. 20 000 - 50 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 0411)
- Poly (Arg, Tyr) 4:1, Mol. Gew. 20 000 - 50 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 7411)
- Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin, Mol. Gew. 15 000 - 30 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4774)
- Poly-L-Glutaminsäure, Mol. Gew. 600 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 1943)
- Poly-L-Glutaminsäure, Mol. Gew. 750 – 1 500 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4868)
- Poly-L-Glutaminsäure, Mol. Gew. 2 000 - 15 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4636)
- Poly (Glu, Ala) 6:4, Mol. Gew. 20 000 - 50 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 1650)

- Poly-Glycin, Mol. Gew. 2 000 - 5 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 8791)
- DL-Homocystein (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. H 4628)
- L-Homocystein (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. H 6010)
- D-Homocystein-Thiolacton (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. H 2767)
- L-Homocystein-Thiolacton (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. H 6503)
- Poly-L-Hydroxyprolin, Mol. Gew. 5 000 - 20 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 0388)
- Lysozym (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. L 6876)
- Poly-L-Ornithin, Mol. Gew. 5 000 - 15 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4538)
- Poly-L-Ornithin, Mol. Gew. 30 000 - 70 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 3655)
- Poly-L-Ornithin, Mol. Gew. 100 000 - 200 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4638)
- Poly-L-Tryptophan, Mol. Gew. 1 000 - 5 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 4647)
- Poly-DL-Tryptophan, Mol. Gew. 5 000 - 15 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. 8514)
- Poly-L-Tyrosin, Mol. Gew. 10 000 - 40 000 (Sigma Chemie GmbH, Produkt Nr. P 1800)

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Messparameter und Nachweismethoden

In der vorliegenden Dissertation wurde die Vermutung angestellt, dass unspezifische Immunkomplexe unter bestimmten Bedingungen aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften hydrophobe bzw. polare Wechselwirkungen zu cholesterinhaltigen Lipoproteinvesikeln entfalten, die eine Bildung von IC-Lipoprotein-Komplexen ermöglichen.

Da es in der Fachliteratur keine Hinweise auf spezifische Nachweismethoden bezüglich der erwähnten IC-Lipoprotein-Komplexe gibt, wurde auf indirektem Wege versucht, die entstandene Bildung dieser Komplexe zu belegen.

Die nachfolgenden Versuche wurden so konzipiert, dass jeweils drei bezüglich der Inhaltsstoffe, ihrer Menge und Konzentration exakt gleiche Ansätze gleichen Volumens hergestellt wurden, die sich zum einen durch das Fehlen (-IC) bzw. Vorhandensein (+IC) von Immunkomplexen unterschieden. Die Ansätze mit vorhandenen Immunkomplexen differierten lediglich dahingehend, dass die Reihenfolge der Substanzzugabe variiert wurde. Im ersten Ansatz wurden die Immunkomplexe fünfzehn Minuten nach der zu testenden Substanz zugegeben, so dass die Testsubstanz zuerst mit den Lipoproteinpartikeln des Plasmas und ohne Störung durch die Immunkomplexe reagieren konnten. Umgekehrt wurde im zweiten Ansatz verfahren: Die Immunkomplexe wurden fünfzehn Minuten vor der Testsubstanz zugegeben, damit diese mit den Lipoproteinpartikeln ungehindert reagieren konnten, bevor die Testsubstanz zugegeben wurde.

Das Hauptkriterium zur Bewertung der Versuche war die relative Veränderung der Cholesterinextinktion in den Probenansätzen. Es wurde dabei von der Überlegung ausgegangen, dass Interaktionen zwischen Cholesterin, Immunkomplexen und den applizierten Substanzen zu Serumdestabilisierungen und zu teilweise optisch erkennbaren Aggregationen der oben genannten Stoffe führen, die sich, je nach Länge der Inkubationszeit, am Boden der Versuchsgläser absetzen. Durch Abpipettieren einer Probe von 5 µl aus dem Überstand des Probenansatzes konnte nun die relative Cholesterinverarmung mit Hilfe des Monotest Cholesterin photometrisch gemessen werden.

Hierbei wurde davon ausgegangen, dass Erniedrigungen der Extinktionswerte einen indirekten Hinweis für die postulierten Interaktionen bzw. Serumdestabilisierungen darstellen.

2.4.2 Auswertung der Resultate

Bei jeder Versuchsreihe wurden drei identische Ansätze hergestellt, aus denen am Tag des Ansetzens, nach einem, nach fünf und zehn Tagen jeweils eine Probe des Überstandes entnommen wurde. Von diesen Proben wurde anschließend die jeweilige Extinktion bestimmt. Aus den drei Extinktionen wurde für jeden Ansatz ein Mittelwert gebildet, der dann mit den anderen Extinktionsmittelwerten verglichen wurde.

Aufgrund der geringen Anzahl der Versuchswiederholungen konnte die Arbeit nicht statistisch ausgewertet werden.

3 Messergebnisse

Als Grundlage für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche war es notwendig, ein Versuchssystem zu erarbeiten, womit in angemessenen Zeiträumen die Interaktion von Immunkomplexen mit cholesterinhaltigen Lipoproteinen nachgewiesen werden konnte. Hierfür bedurfte es zunächst einer großen Anzahl von Vorversuchen.

Es ist selbstverständlich nicht möglich, alle Versuche dieser Dissertation in die Niederschrift aufzunehmen, deshalb sind im Folgenden die Messwerte von 30 ausgewählten Versuchen in tabellarischer und graphischer Form dargestellt, die den allgemeinen Trend widerspiegeln.

Die in den jeweiligen Versuchen verwendeten Testsubstanzen können den Versuchsüberschriften entnommen werden, die Konzentrationen der Testsubstanzen sind in den Kapiteln „Pipettierschema für die Versuche 1 – 21“ bzw. „Pipettierschema für die Versuche 22 – 30“ aufgeführt. Etwaige Abkürzungen sind entweder den Überschriften oder dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

3.1 Bestimmung der Reverenzwerte – Extinktionsänderung ohne Zugabe von Testsubstanzen

Als Beurteilungsgrundlage für die Extinktionsänderungen durch die jeweiligen Testsubstanzen wurden mehrfach Messungen unter den gleichen Bedingungen wie in den späteren Versuchen, jedoch ohne Beigabe von Testsubstanz, durchgeführt. Da die Ergebnisse nur geringe Schwankungsunterschiede zeigten, wurden daraus Mittelwerte gebildet, die als Referenzwert für die Messungen mit Testsubstanzen angesehen werden können. Tabelle 2 zeigt das zugehörige Pipettierschema. Die erhaltenen Extinktionswerte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

In den Abbildungen 1 und 2 sind die Ergebnisse in graphischer Form dargestellt.

Aus diesen Versuchen wurde deutlich, dass sich ohne Zugabe von Testsubstanzen keine nennenswerten Extinktionsänderungen ergeben.

Konzentrationen der Testsubstanzen

| | | | |
|-----|--------------|-------------------|-----------|
| IC | 2 mg/ml | NaCl | 0,9 % |
| NHS | 1:2 verdünnt | CaCl ₂ | 40 mmol/l |
| HCl | 0,1 mol/l | MgCl ₂ | 13 mmol/l |

Pipettierschema

| | ohne Zugabe von IC | | | mit Zugabe von IC | | |
|-------------------|--------------------|-----|-----|-------------------|-----|-----|
| IC | | | | 300 | 300 | 300 |
| NHS | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| NaCl | 630 | 610 | 590 | 330 | 310 | 290 |
| CaCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| MgCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| HCl | | 20 | 40 | | 20 | 40 |

Tab. 2 Pipettierschema für die Referenzwertbestimmung

Messergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| | ohne Zugabe von IC | | | mit Zugabe von IC | | |
|---------------|--------------------|--------------|--------------|-------------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,109 | 0,111 | 0,117 | 0,116 | 0,117 | 0,121 |
| nach 1 Tag | 0,118 | 0,108 | 0,109 | 0,112 | 0,109 | 0,110 |
| nach 5 Tagen | 0,116 | 0,110 | 0,108 | 0,116 | 0,107 | 0,111 |
| nach 10 Tagen | 0,118 | 0,106 | 0,104 | 0,115 | 0,096 | 0,113 |

Tab. 3 Messergebnisse für die Referenzwertbestimmung

Diagramme für die Referenzwertbestimmung

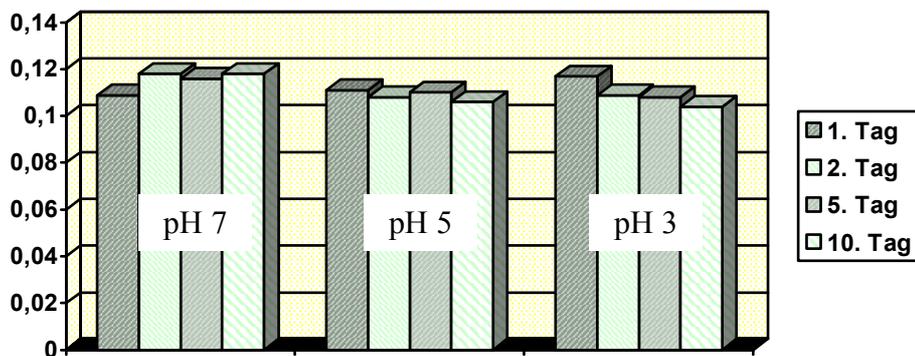


Abbildung 1 Messergebnisse für die Referenzwertbestimmung ohne Zugabe von IC

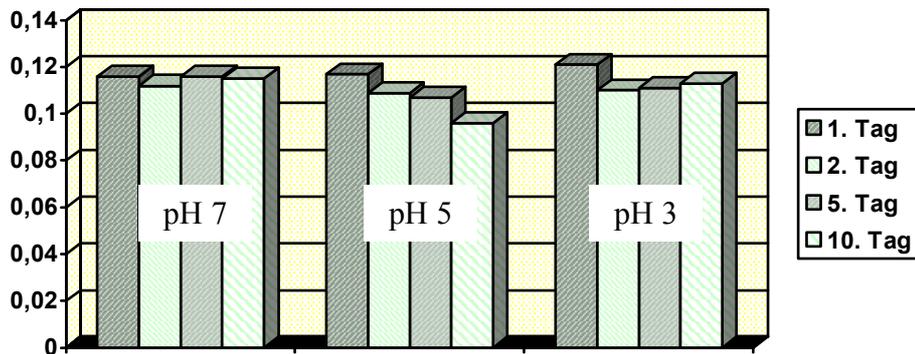


Abbildung 2 Messergebnisse für die Referenzwertbestimmung mit Zugabe von IC

3.2 Pipettierschema für die Versuche 1 – 21

Die Versuche 1 – 21 wurden alle nach dem gleichen, in Tab. 4 dargestellten, Pipettierschema durchgeführt. Die Zahlenwerte in der Tabelle bedeuten Flüssigkeitsvolumen in μl . Beim Ansetzen der Probenröhrchen wurde zunächst eine Grundlösung aus allen aufgeführten Substanzen außer der jeweiligen Testsubstanz und den Immunkomplexen hergestellt. Anschließend wurde nach der in Kapitel 2.4.1 aufgeführten Vorgabe die Testsubstanz bzw. die Immunkomplexe zugegeben. Jeder Einzelversuch wurde dreifach ausgeführt und die gemessenen Ergebnissen zu einem Mittelwert zusammengefasst. Bei großen Schwankungen der Einzelversuche wurden die Ergebnisse und die Probenansätze verworfen und der gesamte Versuch nochmals durchgeführt.

Konzentrationen der Substanzen

| | | | |
|--------------|--------------|-------------------|-----------|
| Testsubstanz | 2 mg/ml | NaCl | 0,9 % |
| IC | 2 mg/ml | CaCl ₂ | 40 mmol/l |
| NHS | 1:2 verdünnt | MgCl ₂ | 13 mmol/l |
| HCl | 0,1 mol/l | | |

Pipettierschema

| | keine Zugabe von IC | | | Zugabe der IC nach Zugabe der Testsubstanz | | | Zugabe der IC vor Zugabe der Testsubstanz | | |
|-------------------|---------------------|-----|-----|--|-----|-----|---|-----|-----|
| Testsubstanz | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IC | | | | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| NHS | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| NaCl | 630 | 610 | 590 | 330 | 310 | 290 | 330 | 310 | 290 |
| CaCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| MgCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| HCl | | 20 | 40 | | 20 | 40 | | 20 | 40 |

Tab. 4 Pipettierschema für die Versuche 1 - 21

3.3 Darstellung der Ergebnisse der Versuche 1 – 21

Die Messergebnisse sind jeweils in drei Tabellen aufgeführt, von denen die erste Tabelle die Ergebnisse für die Versuche ohne Zugabe von Immunkomplexen wiedergibt. Die zweite Tabelle gibt die Ergebnisse für die Versuche wieder, bei denen die Immunkomplexe nach der Testsubstanz zugegeben wurde, und die dritte Tabelle enthält die Werte, die bei den Versuchen mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Testsubstanz ermittelt wurden.

Jede der Tabellen ist so gegliedert, dass in der obersten Zeile angegeben ist, ob Immunkomplexe in dem Ansatz vorhanden sind und wenn ja, ob diese vor oder nach der zu testenden Substanz zugegeben wurden. Unter dieser Zeile teilt sich die Tabelle in vier Spalten. In der linken Spalte ist angegeben, zu welchem Zeitpunkt die Messungen durchgeführt wurden, am Ansatztag, nach einem Tag, nach fünf Tagen und nach zehn Tagen. Die drei weiteren Spalten enthalten die Ergebnisse für den jeweiligen pH-Wert-Bereich.

Die Messungen am Ansatztag wurden gleich nach der Zugabe der Testsubstanz und der Immunkomplexe bzw. nach einer Inkubationszeit von fünfzehn Minuten durchgeführt und stellen den Referenzwert für die Messungen der folgenden Tage dar.

Im Anschluss an die Tabelle werden die Ergebnisse in graphischer Form wiedergegeben. Jeweils eine Graphik zeigt die in den Tabellen eingetragenen Werte. Innerhalb jeder Graphik sind jeweils vier Säulen für die verschiedenen pH-Bereiche zusammengefasst, die die Ergebnisse der Messung am Ansatztag, am zweiten, fünften und zehnten Tag darstellen.

3.4 Einfluss der stark basischen Aminosäure Arginin in verschiedenen Polypeptidgrößen sowie in heteropolymeren Polypeptidketten mit den Aminosäuren Serin, Tryptophan und Tyrosin auf die Stabilität von Serumcholesterin

Arginin ist eine α -Aminosäure, die praktisch in allen Proteinen enthalten ist. Es reagiert aufgrund seiner Seitenketten basisch und gehört deshalb zu den basischen Aminosäuren. Arginin entsteht als Zwischenprodukt des Harnstoffzyklus aus L-Arginin-Bernsteinsäure, die, katalysiert von der Argininsuccinat-Lyase, unter Fumarsäure-Abspaltung in L-Arginin überführt wird, um anschließend zu Ornithin und Harnstoff gespalten zu werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche, die mit der Aminosäure Arginin durchgeführt wurden, dargestellt.

Durch die Versuche sollte untersucht werden, ob sich durch die Variation des Molekulargewichtes der Polypeptidketten oder durch das Vorhandensein der Aminosäuren Serin, Tryptophan und Tyrosin eine Änderung im Präzipitationsverhalten der cholesterinhaltigen LDL-Partikel ergab.

In den einzelnen Versuchen wurde der Einfluß von Immunkomplexen und des pH-Wertes auf die Präzipitation der Plasma-Lipoproteine sowie deren zeitlicher Ablauf untersucht.

Bei der Zugabe von Immunkomplexen war von Interesse, ob die Präzipitation stärker oder schwächer ausfiel, wenn die Immunkomplexe fünfzehn Minuten vor der Testsubstanz zugegeben wurden, so daß diese mit den Serum-Lipoproteinen ohne Beeinflussung durch die Testsubstanz reagieren konnten, bzw. wenn die Testsubstanz fünfzehn Minuten vor den Immunkomplexen zugegeben wurde, wodurch die Testsubstanz ungehindert mit den Lipoproteinen reagieren konnte.

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 20 μ l bzw. 40 μ l 0,1-molarer Salzsäure in den Bereich um die Werte pH 7, pH 5 und pH 3 eingestellt.

3.4.1 Versuch 1: Poly-L-Arginin_{5 000 - 15 000}

In den Tabellen 5 – 7 sind die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-L-Arginin mit dem Molekulargewicht 5000 - 15000 Da durchgeführten Versuche eingetragen.

Die Abbildungen 3 – 5 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Messergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,181 | 0,174 | 0,130 |
| nach 1 Tag | 0,040 | 0,118 | 0,128 |
| nach 5 Tagen | 0,020 | 0,099 | 0,125 |
| nach 10 Tagen | 0,043 | 0,079 | 0,120 |

Tab. 5 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin_{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin _{5 000 - 15 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,171 | 0,186 | 0,133 |
| nach 1 Tag | 0,050 | 0,074 | 0,130 |
| nach 5 Tagen | 0,028 | 0,060 | 0,129 |
| nach 10 Tagen | 0,022 | 0,031 | 0,124 |

Tab. 6 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin_{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Arginin_{5 000 - 15 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin _{5 000 - 15 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,196 | 0,206 | 0,135 |
| nach 1 Tag | 0,051 | 0,081 | 0,136 |
| nach 5 Tagen | 0,028 | 0,061 | 0,131 |
| nach 10 Tagen | 0,026 | 0,029 | 0,123 |

Tab. 7 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin_{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Arginin_{5 000 - 15 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$

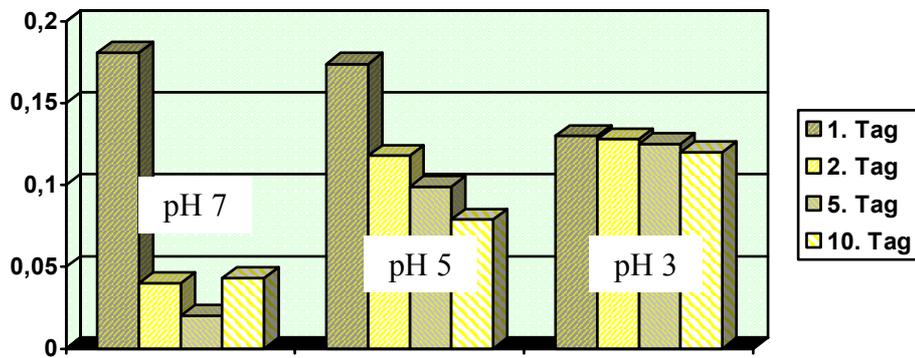


Abbildung 3 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ ohne Zugabe von IC

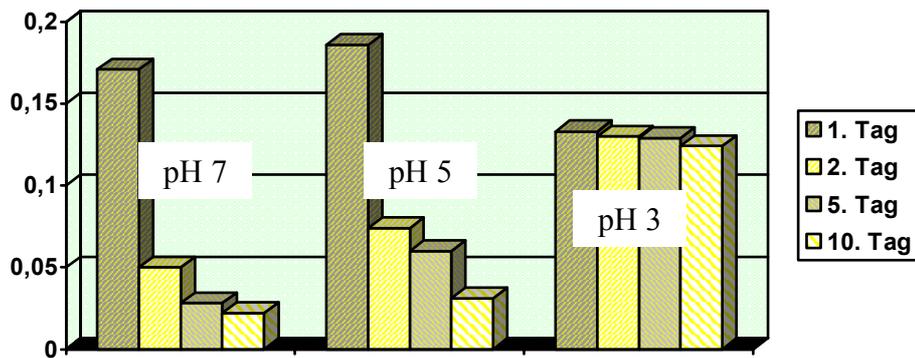


Abbildung 4 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$

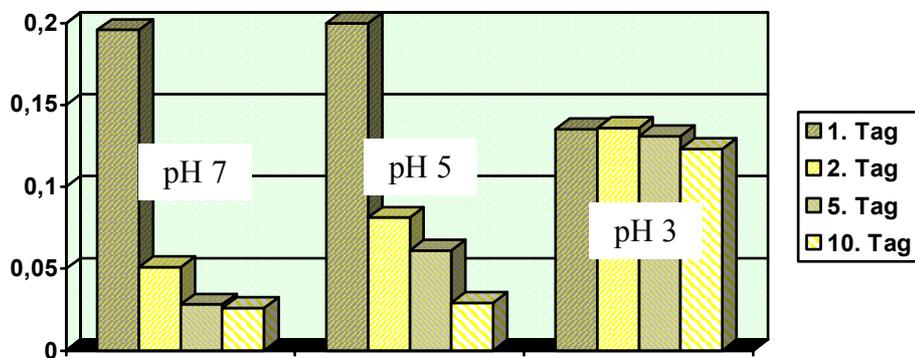


Abbildung 5 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$

3.4.2 Versuch 2: Poly-L-Arginin_{15 000 - 70 000}

In den Tabellen 8 – 10 sind die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-L-Arginin mit dem Molekulargewicht 15000 - 70000 Da durchgeführten Versuche eingetragen.

Die Abbildungen 6 – 8 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,184 | 0,193 | 0,136 |
| nach 1 Tag | 0,032 | 0,103 | 0,124 |
| nach 5 Tagen | 0,015 | 0,085 | 0,120 |
| nach 10 Tagen | 0,030 | 0,081 | 0,122 |

Tab. 8 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin_{15 000 - 70 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin _{15 000 - 70 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,186 | 0,165 | 0,146 |
| nach 1 Tag | 0,032 | 0,071 | 0,137 |
| nach 5 Tagen | 0,017 | 0,051 | 0,133 |
| nach 10 Tagen | 0,016 | 0,051 | 0,135 |

Tab. 9 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin_{15 000 - 70 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Arginin_{15 000 - 70 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin _{15 000 - 70 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,184 | 0,177 | 0,133 |
| nach 1 Tag | 0,042 | 0,072 | 0,124 |
| nach 5 Tagen | 0,021 | 0,046 | 0,130 |
| nach 10 Tagen | 0,013 | 0,042 | 0,120 |

Tab. 10 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin_{15 000 - 70 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Arginin_{15 000 - 70 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000

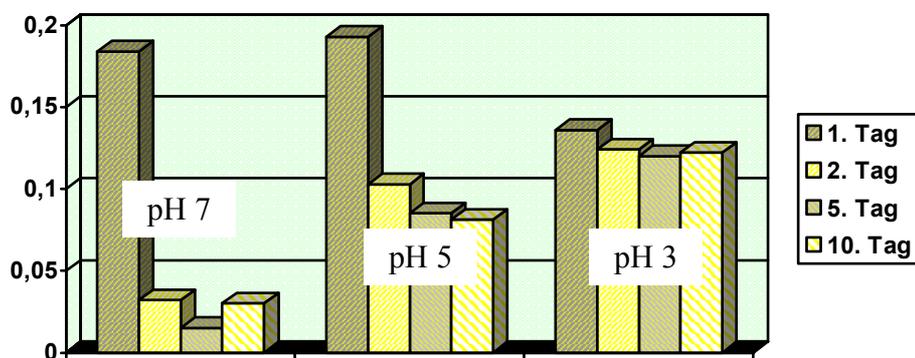


Abbildung 6 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 ohne Zugabe von IC

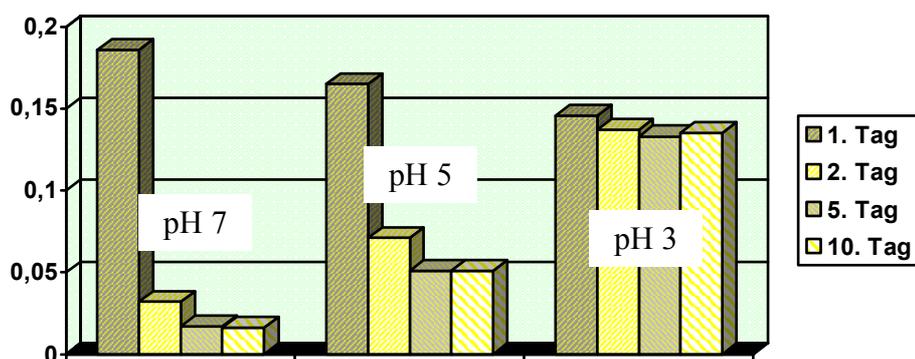


Abbildung 7 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000

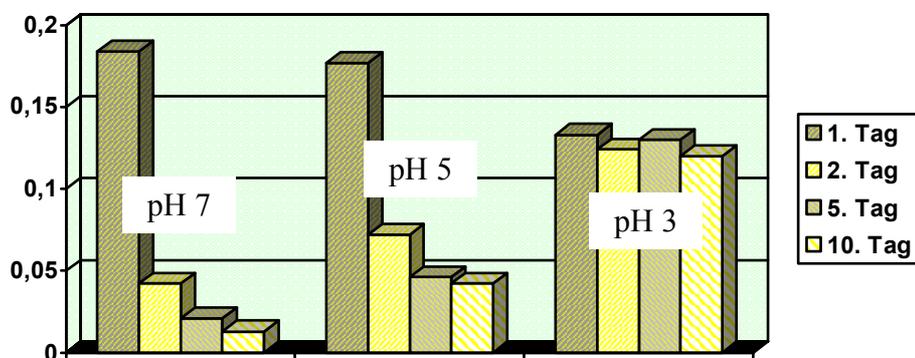


Abbildung 8 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000

3.4.3 Versuch 3: Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000}

Die Tabellen 11 – 13 enthalten die Messergebnisse für die Substanz Poly-L-Arginin mit dem Molekulargewicht 70 000 – 150 000 Da.

Die Abbildungen 9 – 11 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,192 | 0,146 | 0,117 |
| nach 1 Tag | 0,019 | 0,106 | 0,111 |
| nach 5 Tagen | 0,024 | 0,107 | 0,113 |
| nach 10 Tagen | 0,026 | 0,104 | 0,112 |

Tab. 11 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,145 | 0,175 | 0,122 |
| nach 1 Tag | 0,016 | 0,047 | 0,115 |
| nach 5 Tagen | 0,025 | 0,039 | 0,113 |
| nach 10 Tagen | 0,004 | 0,031 | 0,112 |

Tab. 12 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,163 | 0,198 | 0,118 |
| nach 1 Tag | 0,016 | 0,041 | 0,114 |
| nach 5 Tagen | 0,011 | 0,030 | 0,110 |
| nach 10 Tagen | 0,006 | 0,028 | 0,112 |

Tab. 13 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Arginin _{70 000 - 150 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000

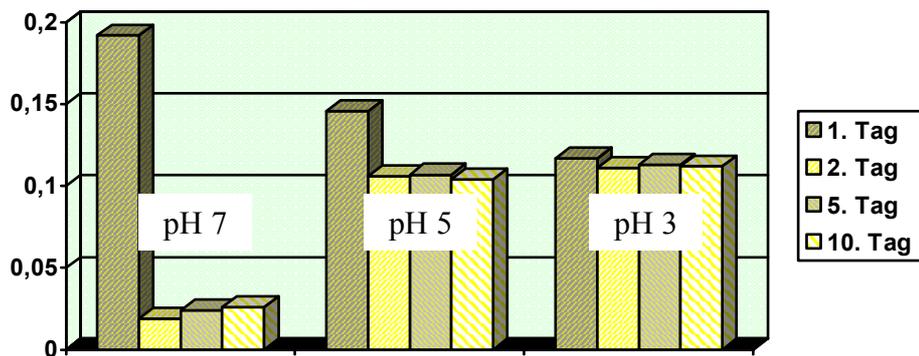


Abbildung 9 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 ohne Zugabe von IC

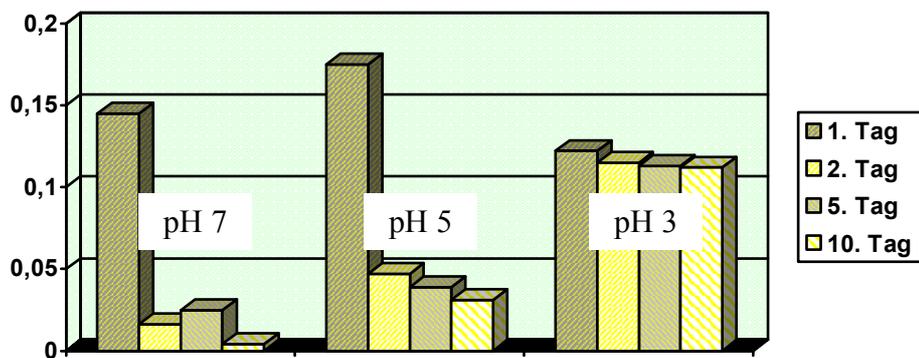


Abbildung 10 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000

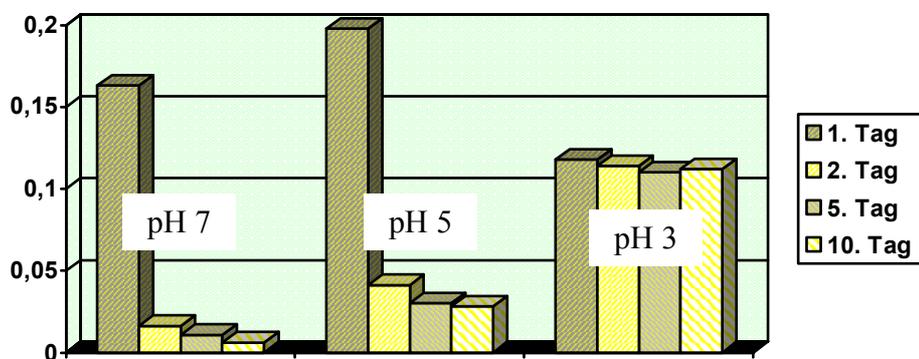


Abbildung 11 Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000

3.4.4 Versuch 4: Poly (Arg, Ser) 3:1

In den Tabellen 14 – 16 finden sich die Messergebnisse für die Versuche mit Polypeptidketten, bestehend aus Arginin und Serin im Mischungsverhältnis 3:1.

Die Abbildungen 12 – 14 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,136 | 0,135 | 0,124 |
| nach 1 Tag | 0,022 | 0,022 | 0,119 |
| nach 5 Tagen | 0,028 | 0,029 | 0,114 |
| nach 10 Tagen | 0,046 | 0,047 | 0,092 |

Tab. 14 Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1 | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,110 | 0,131 | 0,120 |
| nach 1 Tag | 0,018 | 0,019 | 0,124 |
| nach 5 Tagen | 0,027 | 0,027 | 0,114 |
| nach 10 Tagen | 0,021 | 0,017 | 0,116 |

Tab. 15 Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1 | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,127 | 0,128 | 0,124 |
| nach 1 Tag | 0,017 | 0,015 | 0,121 |
| nach 5 Tagen | 0,021 | 0,018 | 0,116 |
| nach 10 Tagen | 0,014 | 0,016 | 0,111 |

Tab. 16 Meßergebnisse Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1

Diagramme für die Testsubstanz Poly (Arg, Ser) 3:1

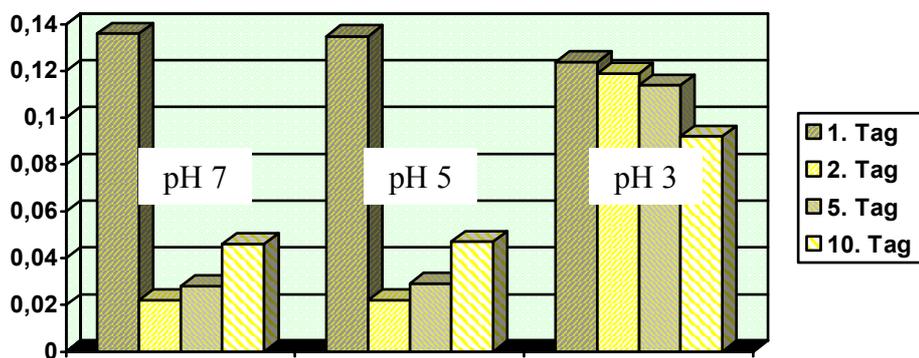


Abbildung 12 Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 ohne Zugabe von IC

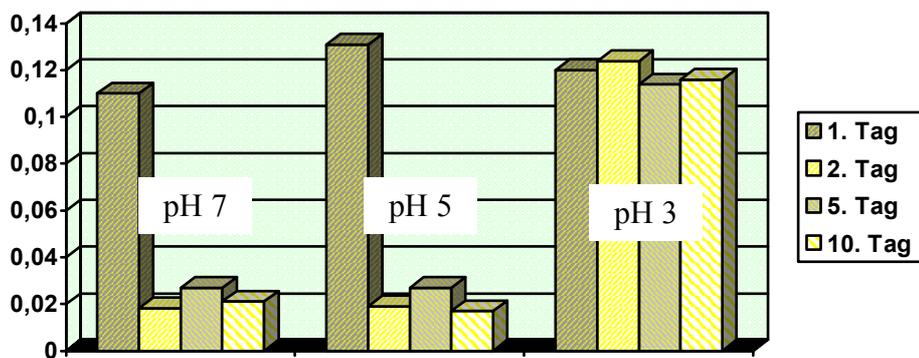


Abbildung 13 Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1

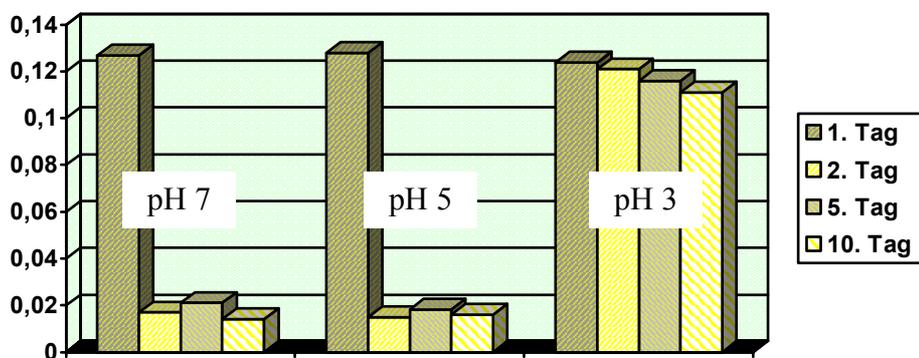


Abbildung 14 Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1

3.4.5 Versuch 5: Poly (Arg, Trp) 4:1

Die Tabellen 17 – 19 enthalten die Messergebnisse für die mit Polypeptidketten, bestehend aus Arginin und Tryptophan im Mischungsverhältnis 4:1, durchgeführten Versuche.

Die Abbildungen 15 – 17 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,138 | 0,228 | 0,125 |
| nach 1 Tag | 0,083 | 0,008 | 0,120 |
| nach 5 Tagen | 0,038 | 0,003 | 0,118 |
| nach 10 Tagen | 0,005 | 0,005 | 0,119 |

Tab. 17 Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1 | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,139 | 0,217 | 0,135 |
| nach 1 Tag | 0,036 | 0,004 | 0,128 |
| nach 5 Tagen | 0,023 | 0,004 | 0,128 |
| nach 10 Tagen | 0,003 | 0,006 | 0,128 |

Tab. 18 Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1 | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,132 | 0,196 | 0,121 |
| nach 1 Tag | 0,048 | 0,006 | 0,116 |
| nach 5 Tagen | 0,017 | 0,003 | 0,117 |
| nach 10 Tagen | 0,006 | 0,006 | 0,113 |

Tab. 19 Meßergebnisse Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1

Diagramme für die Testsubstanz Poly (Arg, Trp) 4:1

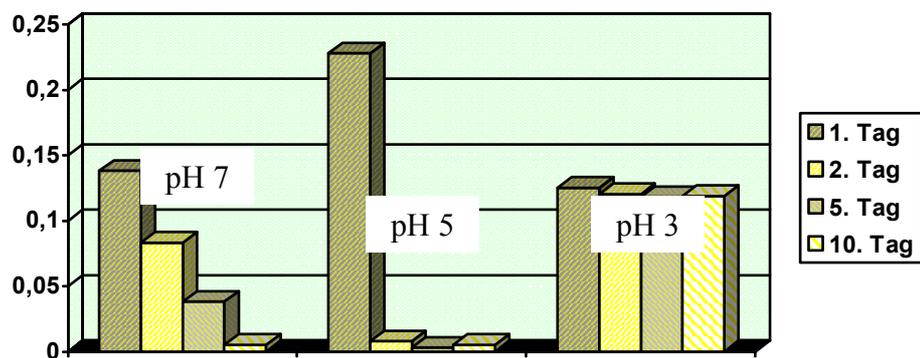


Abbildung 15 Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 ohne Zugabe von IC

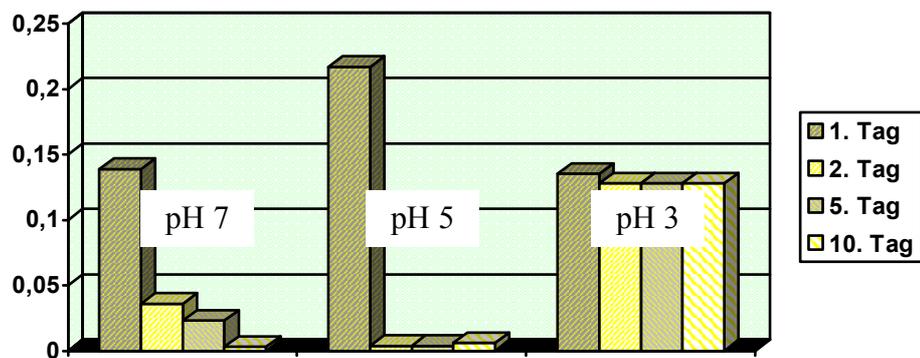


Abbildung 16 Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1

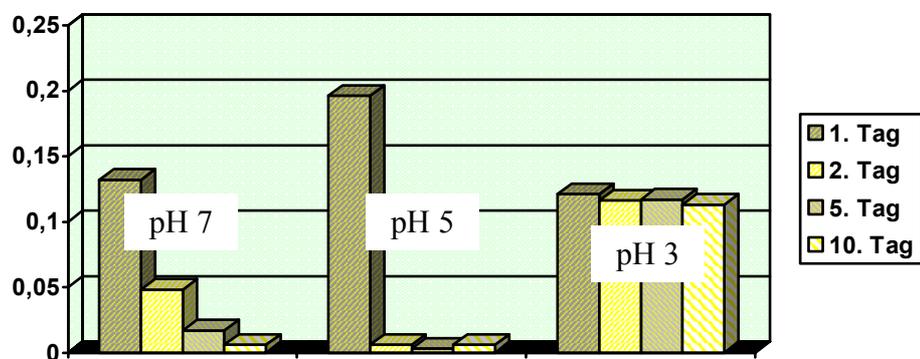


Abbildung 17 Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1

3.4.6 Versuch 6: Poly (Arg, Tyr)

In den Tabellen 20 – 22 sind die Versuchsergebnisse eingetragen, die mit Polypeptidketten, bestehend aus Arginin und Tryptophan im Mischungsverhältnis 4:1 erzielt wurden.

Die Abbildungen 18 – 20 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,178 | 0,211 | 0,126 |
| nach 1 Tag | 0,031 | 0,043 | 0,124 |
| nach 5 Tagen | 0,013 | 0,036 | 0,121 |
| nach 10 Tagen | 0,015 | 0,025 | 0,123 |

Tab. 20 Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly (Arg, Tyr) | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,159 | 0,185 | 0,124 |
| nach 1 Tag | 0,016 | 0,021 | 0,121 |
| nach 5 Tagen | 0,011 | 0,019 | 0,123 |
| nach 10 Tagen | 0,006 | 0,015 | 0,122 |

Tab. 21 Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly (Arg, Tyr)

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly (Arg, Tyr) | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,163 | 0,183 | 0,125 |
| nach 1 Tag | 0,022 | 0,021 | 0,121 |
| nach 5 Tagen | 0,013 | 0,017 | 0,121 |
| nach 10 Tagen | 0,012 | 0,014 | 0,124 |

Tab. 22 Meßergebnisse Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly (Arg, Tyr)

Diagramme für die Testsubstanz Poly (Arg, Tyr)

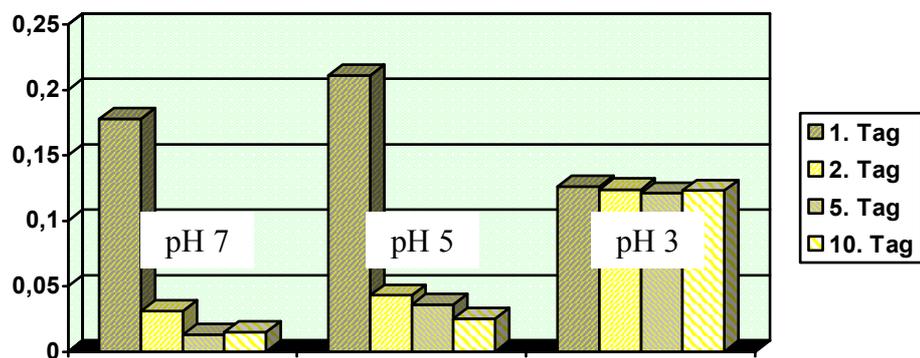


Abbildung 18 Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) ohne Zugabe von IC

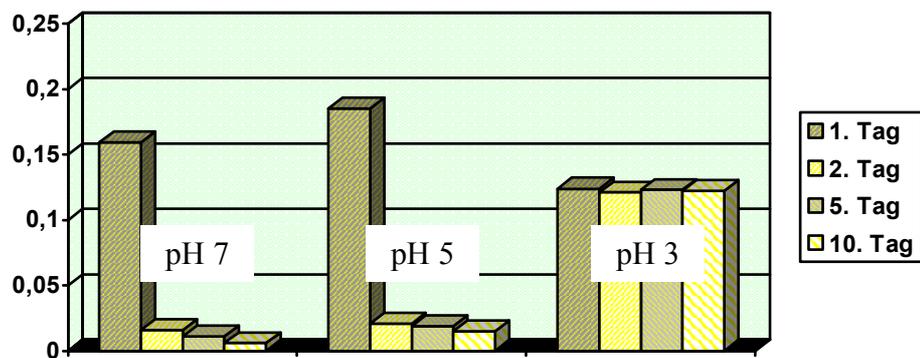


Abbildung 19 Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly (Arg, Tyr)

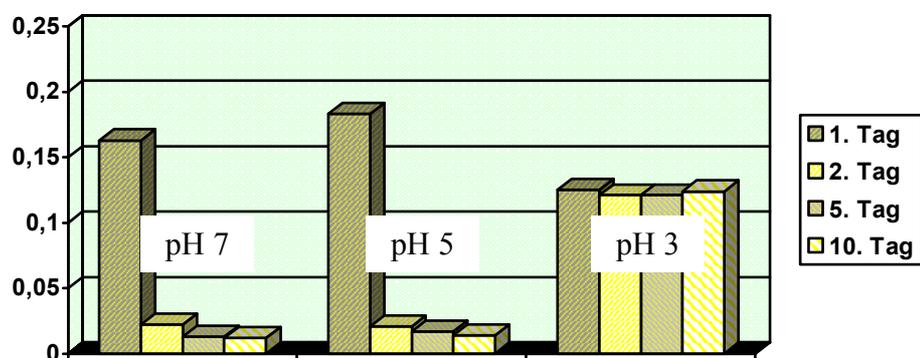


Abbildung 20 Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly (Arg, Tyr)

3.4.7 Ergebnisse der Untersuchungen mit der basischen Aminosäure Arginin

Den größten Einflussfaktor auf die Präzipitation von Lipoproteinen stellt in dieser Versuchsreihe der pH-Wert dar. Je höher der pH-Wert in unserer Untersuchung gewählt wurde, desto stärker war die Präzipitation. Während es bei pH 7 durchgehend zu einer sehr stark ausgeprägten und raschen Präzipitation kam, war diese bei pH 5 weniger stark vorhanden. Bei pH 3 waren durch keine der von uns gewählten Bedingungen Änderungen der Cholesterinwerte zu erzielen. Durch Immunkomplexe konnte im allgemeinen eine leichte Beschleunigung der Präzipitation erzielt werden, und zwar im Wesentlichen unabhängig vom Zeitpunkt der Zugabe. In Versuch 3 konnten bei pH 5 überhaupt erst Immunkomplexe eine Präzipitation ermöglichen. Der Einfluss der Molekülgröße zeigte sich ebenfalls, wie im Weiteren ausgeführt wird.

In Versuch 1 mit Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ ist neben der allgemeinen Tendenz der pH-Abhängigkeit bei pH 5 eine geringe Präzipitationsbeschleunigung durch Immunkomplexe, unabhängig vom Zeitpunkt ihrer Zugabe, zu erkennen. Das gleiche Bild zeigt sich in Versuch 2 mit Poly-L-Arginin $15\ 000 - 70\ 000$.

Versuch 3 zeigt, dass auch die Molekülgröße einen Einfluß auf die Präzipitation hat. Hier kommt es bei einem Molekulargewicht des Poly-L-Arginin von $70\ 000 - 150\ 000$ bei pH 5 zu keiner Abnahme der Extinktionswerte. Die Präzipitation kann aber durch Zugabe von Immunkomplexen ausgelöst werden und fällt dann ebenso deutlich aus wie in den vorausgehenden Versuchen.

Die Anwesenheit von Serin bei Versuch 4 mit Poly (Arg, Ser) 3:1 führt zu keinen wesentlich veränderten Ergebnissen.

Versuch 5 mit Poly (Arg, Trp) 4:1 zeigt eine Verschiebung der größten Extinktionsabnahme in den leicht sauren Bereich bei pH 5. Die Cholesterinwerte im Überstand waren bei pH 5 deutlich niedriger als bei pH 7. Auch war die Abnahme deutlicher ausgeprägt. Bei pH 3 kam es auch hier zu keiner Präzipitation. Einfluß durch Immunkomplexe kann hierbei, möglicherweise aufgrund der grundsätzlich sehr raschen Präzipitation nicht festgestellt werden.

In Versuch 6 mit Poly (Arg, Tyr) war die Änderung insgesamt etwas stärker ausgeprägt als bei Arginin allein, es zeigte sich aber die gleiche Grundtendenz.

3.5 Einfluss der sauren Aminosäure Asparaginsäure in verschiedenen Polypeptidgrößen und bei unterschiedlicher Chiralität auf die Stabilität von Serumcholesterin

Asparaginsäure, eine der proteinogenen L- α -Aminosäuren, wird aufgrund der Carbonsäuren der Seitenketten zu den sauren Aminosäuren gerechnet. Sie wird aus Oxalacetat über eine Transaminierung gebildet. Hierbei ist L-Glutamat der Aminogruppen-Donor. Es entsteht α -Ketoglutarat und Aspartat. Die Umkehrreaktion führt zum Abbau von Asparaginsäure und damit zur Einschleusung des C₄-Gerüsts in den Citratzyklus. In einem für Pflanzen und Mikroorganismen typischen Abbauweg wird Asparaginsäure durch das Enzym Aspartase zu Fumarat und Ammoniak gespalten. Diese reversible Reaktion kann jedoch bei Ammoniaküberschuß auch zur Bildung von Asparaginsäure führen. Asparagin reagiert im Rahmen des Harnstoffzyklus mit Citrullin zu Argininsuccinat, wodurch die Aminogruppe der Asparaginsäure letztlich zu einer der Amidgruppen des Harnstoff umgewandelt wird. Auch die N₁-Position der Purine, die 6-Aminogruppen des Adenins und die N₁-Position der Pyrimidine leiten sich von der Aminogruppe der Asparaginsäure ab.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche, die mit der Aminosäure Asparaginsäure durchgeführt wurden, dargestellt.

Durch die Versuche sollte zum einen gezeigt werden, welchen Einfluß das Molekulargewicht auf die Präzipitation hat, und zum anderen, ob sich bei geänderter Chiralität des Moleküls Unterschiede ergeben.

In den einzelnen Versuchen wurde der Einfluß von Immunkomplexen und des pH-Wertes auf die Präzipitation der Plasma-Lipoproteine sowie deren zeitlicher Ablauf untersucht.

Bei der Zugabe von Immunkomplexen war von Interesse, ob sich eine Änderung des Verhaltens ergibt, wenn die Immunkomplexe fünfzehn Minuten vor der Testsubstanz zugegeben wurden, so dass diese mit den Serum-Lipoproteinen ungestört reagieren konnten, bzw. wenn die Testsubstanz fünfzehn Minuten vor den Immunkomplexen zugegeben wurde.

3.5.1 Versuch 7: Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000}

Die Messergebnisse in den Tabellen 23 – 25 zeigen die Versuchsergebnisse mit der Substanz Poly-L-Asparaginsäure mit dem Molekulgewicht von 5000 – 15000 Da.

Die Abbildungen 21 – 23 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,124 | 0,127 | 0,128 |
| nach 1 Tag | 0,114 | 0,114 | 0,118 |
| nach 5 Tagen | 0,112 | 0,110 | 0,112 |
| nach 10 Tagen | 0,110 | 0,098 | 0,108 |

Tab. 23 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,131 | 0,118 | 0,115 |
| nach 1 Tag | 0,111 | 0,103 | 0,132 |
| nach 5 Tagen | 0,108 | 0,103 | 0,130 |
| nach 10 Tagen | 0,112 | 0,057 | 0,058 |

Tab. 24 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,121 | 0,114 | 0,126 |
| nach 1 Tag | 0,116 | 0,100 | 0,119 |
| nach 5 Tagen | 0,116 | 0,098 | 0,117 |
| nach 10 Tagen | 0,112 | 0,059 | 0,113 |

Tab. 25 Meßergebnisse Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{5 000 - 15 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000

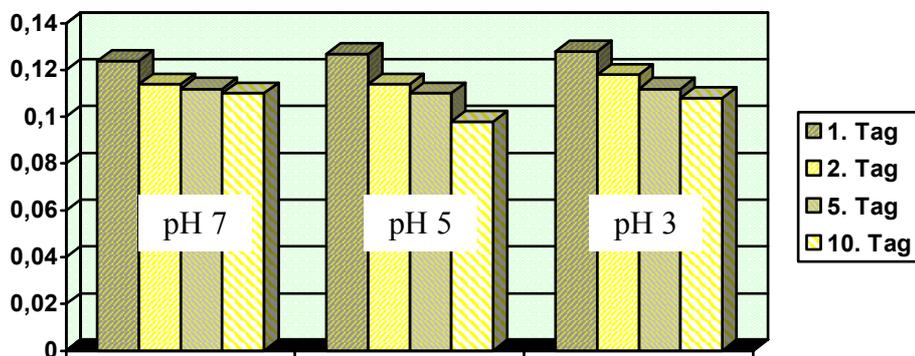


Abbildung 21 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 ohne Zugabe von IC

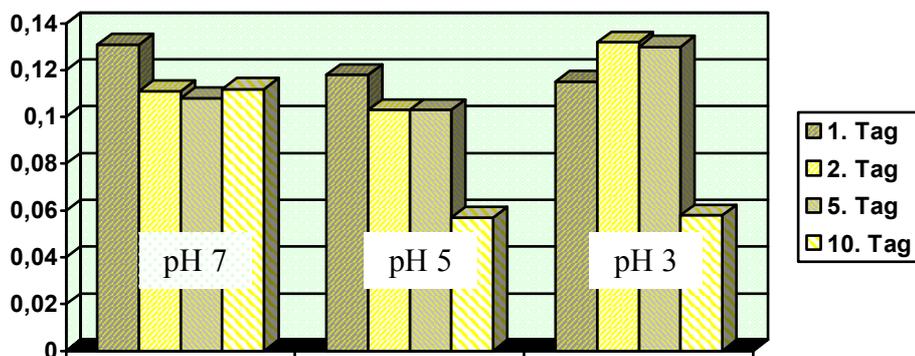


Abbildung 22 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000

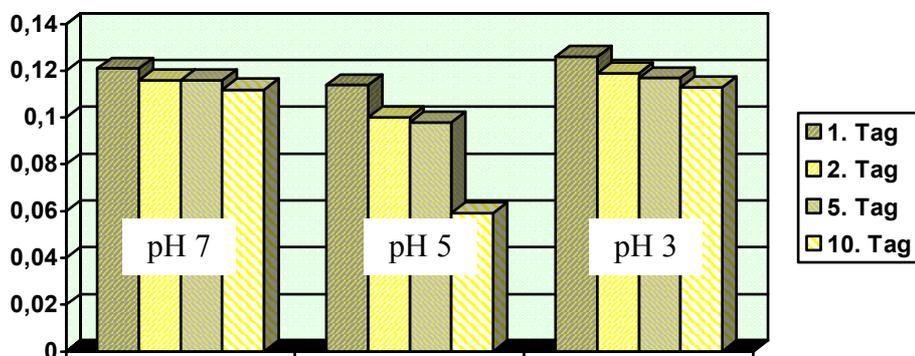


Abbildung 23 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000

3.5.2 Versuch 8: Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000}

In den Tabellen 26 – 28 sind die Messergebnisse für die Versuche dargestellt, die mit der Substanz Poly-L-Asparaginsäure mit dem Molekulgewicht von 15000 – 50000 Da durchgeführt wurden.

Die Abbildungen 24 – 26 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,107 | 0,107 | 0,098 |
| nach 1 Tag | 0,113 | 0,107 | 0,042 |
| nach 5 Tagen | 0,106 | 0,104 | 0,042 |
| nach 10 Tagen | 0,111 | 0,094 | 0,033 |

Tab. 26 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,108 | 0,109 | 0,095 |
| nach 1 Tag | 0,110 | 0,103 | 0,035 |
| nach 5 Tagen | 0,111 | 0,104 | 0,034 |
| nach 10 Tagen | 0,111 | 0,068 | 0,028 |

Tab. 27 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,108 | 0,120 | 0,103 |
| nach 1 Tag | 0,110 | 0,118 | 0,033 |
| nach 5 Tagen | 0,120 | 0,117 | 0,030 |
| nach 10 Tagen | 0,110 | 0,112 | 0,032 |

Tab. 28 Meßergebnisse Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure _{15 000 - 50 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000

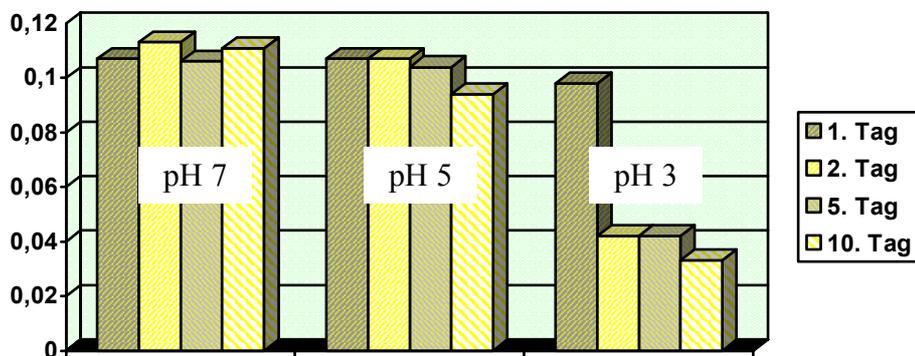


Abbildung 24 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 ohne Zugabe von IC

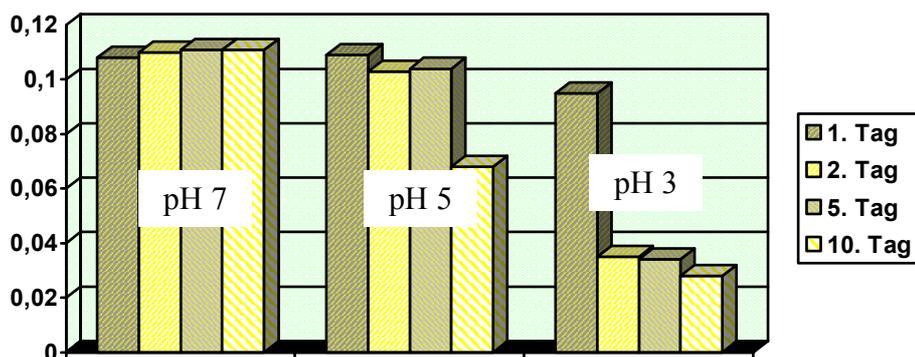


Abbildung 25 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000

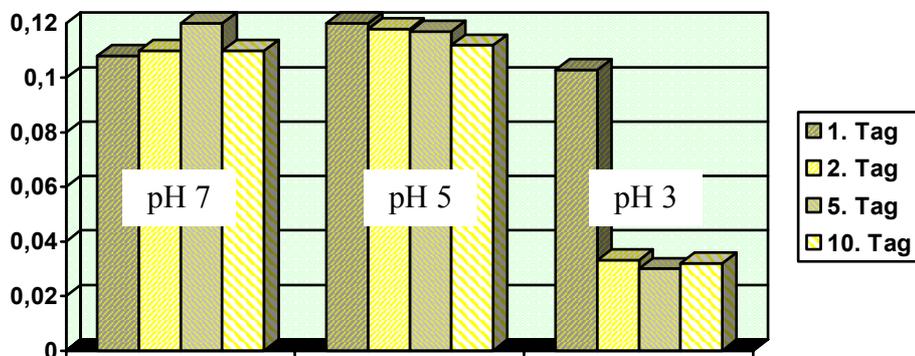


Abbildung 26 Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000

3.5.3 Versuch 9: Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$

Die Versuchsergebnisse mit der Substanz Poly-DL-Asparaginsäure mit dem Molekulargewicht von $2000 - 10000$ Da sind in den Tabellen 29 – 31 dargestellt.

Die Abbildungen 27 – 29 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,086 | 0,114 | 0,106 |
| nach 1 Tag | 0,087 | 0,110 | 0,066 |
| nach 5 Tagen | 0,089 | 0,113 | 0,064 |
| nach 10 Tagen | 0,089 | 0,103 | 0,044 |

Tab. 29 Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$ ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$ | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,107 | 0,109 | 0,105 |
| nach 1 Tag | 0,108 | 0,102 | 0,087 |
| nach 5 Tagen | 0,107 | 0,099 | 0,077 |
| nach 10 Tagen | 0,108 | 0,043 | 0,071 |

Tab. 30 Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$ mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$ | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,110 | 0,109 | 0,104 |
| nach 1 Tag | 0,106 | 0,100 | 0,048 |
| nach 5 Tagen | 0,111 | 0,102 | 0,045 |
| nach 10 Tagen | 0,110 | 0,080 | 0,033 |

Tab. 31 Meßergebnisse Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$ mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure $2\,000 - 10\,000$

Diagramme für die Testsubstanz Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000

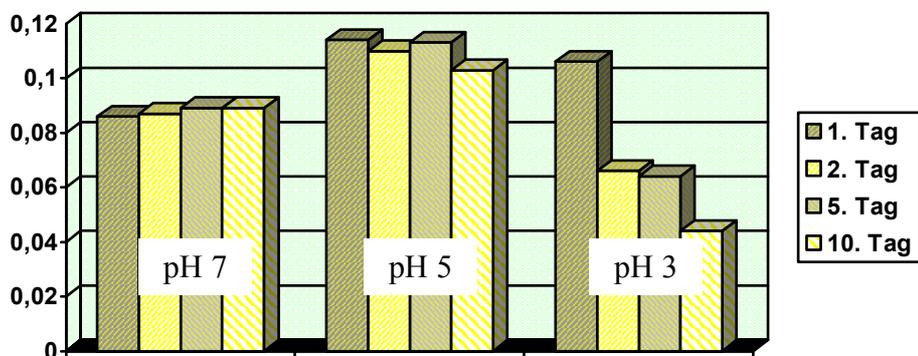


Abbildung 27 Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 ohne Zugabe von IC

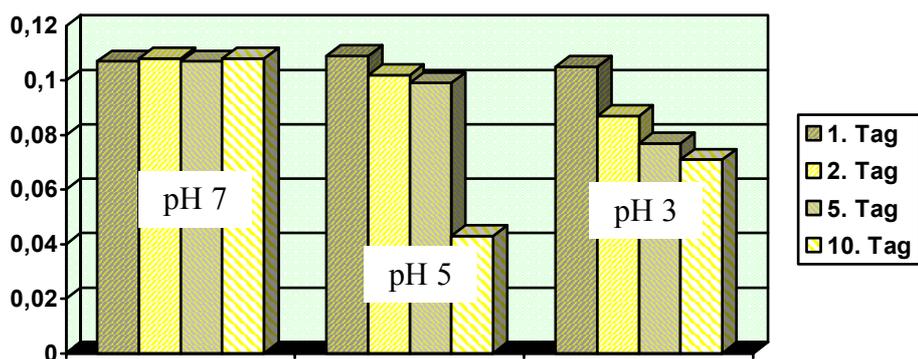


Abbildung 28 Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000

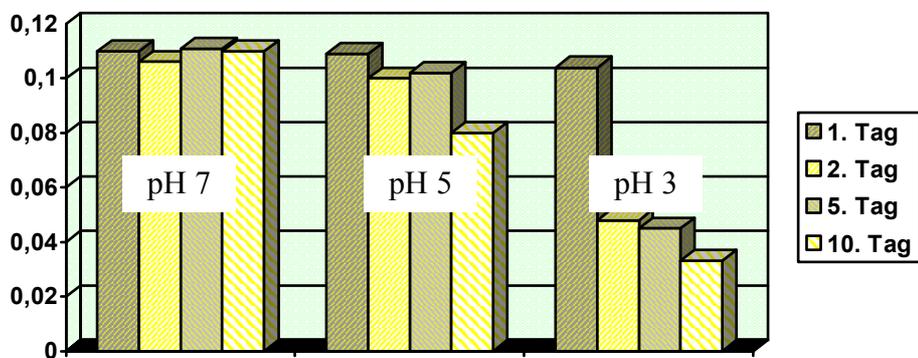


Abbildung 29 Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000

3.5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Versuche mit der sauren Aminosäure Asparaginsäure zeigen eine Abhängigkeit der Ergebnisse sowohl vom Molekulgewicht, als auch von der Chiralität des Moleküls. Außerdem ist neben der sehr deutlichen Änderung des Verhaltens bei unterschiedlichen pH-Werten auch der Einfluß von Immunkomplexen zu erkennen.

Versuch 7 (mit Poly-L-Asparaginsäure $5\ 000 - 15\ 000$) zeigt ohne Beigabe von Immunkomplexen keine wesentlichen Unterschiede der Extinktionwerte. Bei Zugabe von Immunkomplexen zeigt sich bei einem pH-Wert von 5 eine langsam ablaufende Präzipitation, durch die die Cholesterinwerte im Überstand über den Verlauf von zehn Tagen auf ca. die Hälfte abnehmen. Werden die Immunkomplexe vor der Testsubstanz beigegeben, so zeigt sich auch bei pH 3 eine langsame Abnahme der Extinktion.

Bei Versuch 8 (mit der etwas schwereren Poly-L-Asparaginsäure $15\ 000 - 50\ 000$) verschiebt sich die pH-Wert-Abhängigkeit von pH 5 zu pH 3. Der Einfluß von Immunkomplexen ist weniger stark ausgeprägt, es kommt aber insgesamt zu einer schneller ablaufenden Präzipitation. Die Variation der Reihenfolge der Zugabe von Immunkomplexen und Testsubstanz zeigt hier keine eindeutigen Unterschiede.

Poly-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$, die in Versuch 9 untersucht wurde, legt eine Abhängigkeit der Präzipitation von der Chiralität der einzelnen Aminosäure nahe. Hier ist bei pH 7, wie auch in den beiden vorangegangenen Versuchen, keine Änderung der Extinktion zu erkennen. Im Gegensatz zu Versuch 7 liegt die stärkste Abnahme aber nicht bei pH 5, sondern bei pH 3 vor. Die größte Abnahme der Extinktion zeigt sich nach zehn Tagen bei pH 3, wenn die Immunkomplexe erst nach entsprechender Inkubationszeit des Grundansatzes mit der Testsubstanz beigegeben werden. Werden die Immunkomplexe vor der Testsubstanz zugegeben, so fällt die Extinktionsabnahme hier bei pH 3 geringer aus, als ohne Beigabe von Immunkomplexen. Jedoch zeigt sich in diesem Fall bei einem pH-Wert von 5 bis zum zehnten Tage eine etwa 50 %-ige Abnahme der Extinktion, die ohne Zugabe von Immunkomplexen nicht auftritt und bei veränderter Reihenfolge nur sehr gering ausfällt.

3.6 Untersuchungen zur Plasmadestabilisierung durch verschiedene Enantiomere der Aminosäure Homocystein sowie seines Thioesters Homocystein-Thiolacton

Homocystein ist ein Abbauprodukt des Methionins, aus dem es sich über S-Adenosylmethionin und S-Adenosylhomocystein bildet, um entweder über Cystathionin zu Cystein weiter umgewandelt zu werden oder durch andere Reaktionsschritte in Bernsteinsäure überzugehen und damit in den Citratzyklus eingeschleust zu werden. Andererseits ist Homocystein eine Vorstufe des Methionins, das durch Methylierung von Homocystein entsteht. Homocystein ist damit in einen Zyklus bei dem Transfer aktivierter Methylgruppen eingebunden.

Homocystein-Thiolacton, ein reaktiver Thioester, entsteht bei Folsäure- oder Vitamin-B₁₂-Mangel aus Homocystein.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche, die mit Homocystein und Homocystein-Thiolacton durchgeführt wurden, dargestellt.

In den Versuchen 10 - 13 sollte der Einfluß von Homocystein- und Homocystein-Thiolacton-Polypeptiden unterschiedlicher Chiralität auf das Bindungsverhalten mit Lipoproteinen untersucht werden. Versuch 10 und Versuch 11 zeigen die Ergebnisse für die Substanzen DL-Homocystein und L-Homocystein. Die Versuche 12 und 13 wurden mit D-Homocystein-Thiolacton und L-Homocystein-Thiolacton durchgeführt.

3.6.1 Versuch 10: DL-Homocystein

In den Tabellen 32 – 34 finden sich die Messergebnisse für die mit der Substanz DL-Homocystein durchgeführten Versuche.

Die Abbildungen 30 – 32 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,030 | 0,026 | 0,025 |
| nach 1 Tag | 0,046 | 0,023 | 0,023 |
| nach 5 Tagen | 0,086 | 0,026 | 0,026 |
| nach 10 Tagen | 0,104 | 0,025 | 0,027 |

Tab. 32 Meßergebnisse für DL-Homocystein ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von DL-Homocystein | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,030 | 0,026 | 0,025 |
| nach 1 Tag | 0,043 | 0,026 | 0,024 |
| nach 5 Tagen | 0,085 | 0,029 | 0,032 |
| nach 10 Tagen | 0,101 | 0,037 | 0,027 |

Tab. 33 Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von DL-Homocystein

| Zugabe der IC vor Zugabe von DL-Homocystein | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,029 | 0,025 | 0,024 |
| nach 1 Tag | 0,042 | 0,023 | 0,022 |
| nach 5 Tagen | 0,074 | 0,025 | 0,023 |
| nach 10 Tagen | 0,101 | 0,027 | 0,026 |

Tab. 34 Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von DL-Homocystein

Diagramme für die Testsubstanz DL-Homocystein

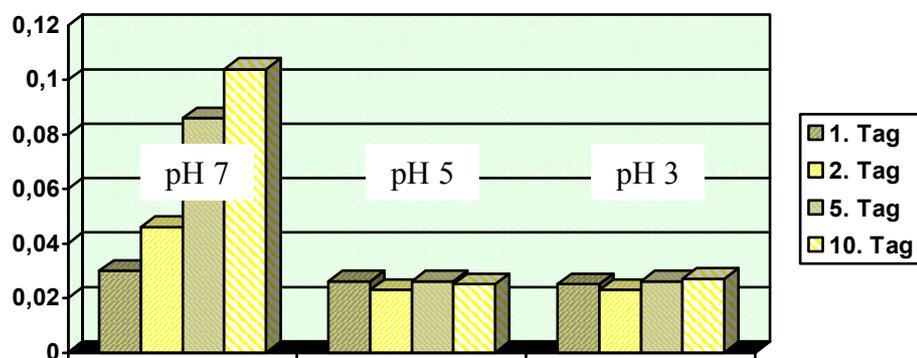


Abbildung 30 Meßergebnisse für DL-Homocystein ohne Zugabe von IC

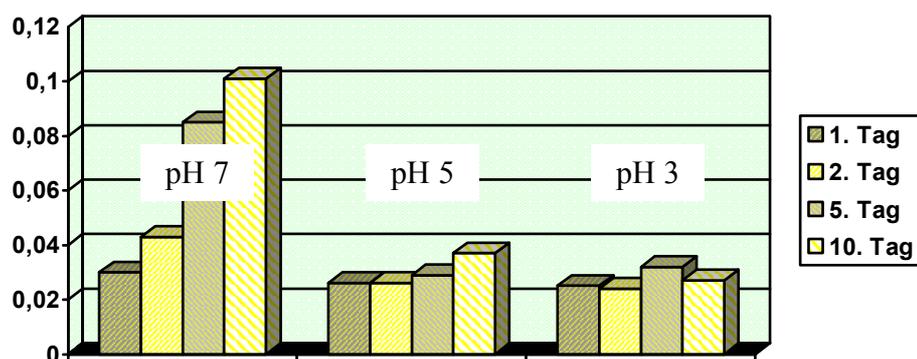


Abbildung 31 Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe von IC nach Zugabe von DL-Homocystein

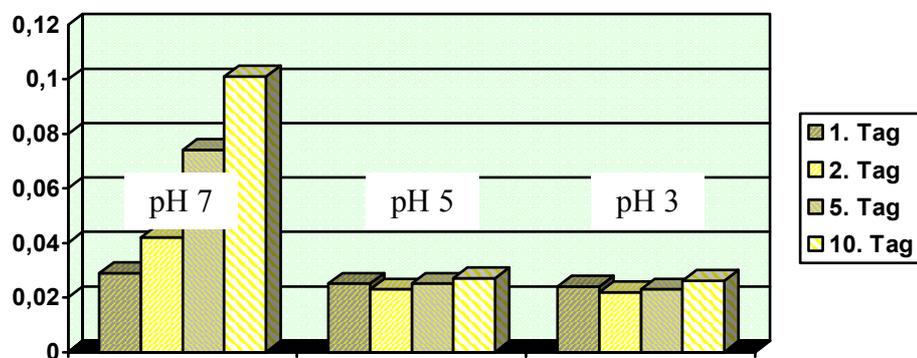


Abbildung 32 Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe von IC vor Zugabe von DL-Homocystein

3.6.2 Versuch 11: L-Homocystein

In den Tabellen 35 – 37 sind die Messergebnisse für die mit der Substanz L-Homocystein durchgeführten Versuche eingetragen.

Die Abbildungen 33 – 35 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,111 | 0,107 | 0,107 |
| nach 1 Tag | 0,107 | 0,106 | 0,109 |
| nach 5 Tagen | 0,106 | 0,099 | 0,096 |
| nach 10 Tagen | 0,104 | 0,099 | 0,094 |

Tab. 35 Meßergebnisse für L-Homocystein ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von L-Homocystein | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,110 | 0,107 | 0,109 |
| nach 1 Tag | 0,109 | 0,100 | 0,107 |
| nach 5 Tagen | 0,101 | 0,095 | 0,101 |
| nach 10 Tagen | 0,104 | 0,082 | 0,103 |

Tab. 36 Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von L-Homocystein

| Zugabe der IC vor Zugabe von L-Homocystein | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,109 | 0,110 | 0,107 |
| nach 1 Tag | 0,110 | 0,111 | 0,102 |
| nach 5 Tagen | 0,105 | 0,110 | 0,095 |
| nach 10 Tagen | 0,107 | 0,110 | 0,089 |

Tab. 37 Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von L-Homocystein

Diagramme für die Testsubstanz L-Homocystein

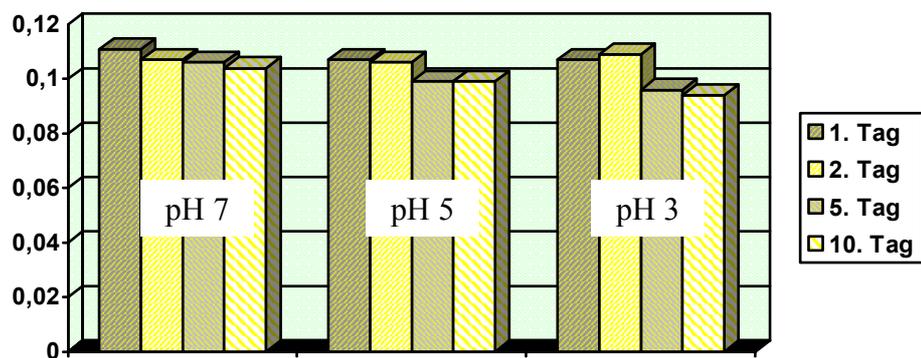


Abbildung 33 Meßergebnisse für L-Homocystein ohne Zugabe von IC

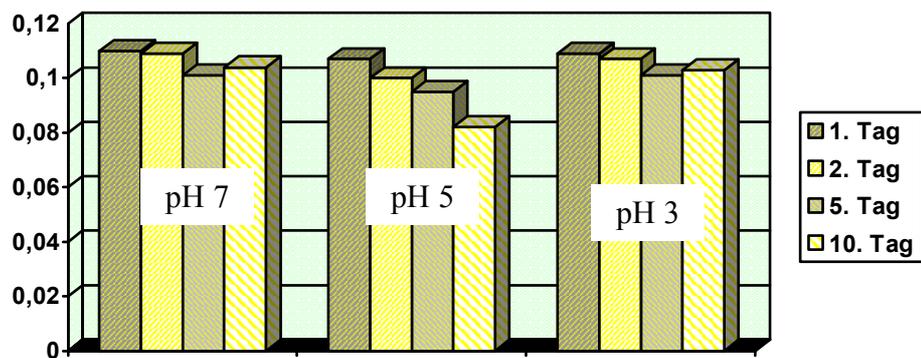


Abbildung 34 Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe von IC nach Zugabe von L-Homocystein

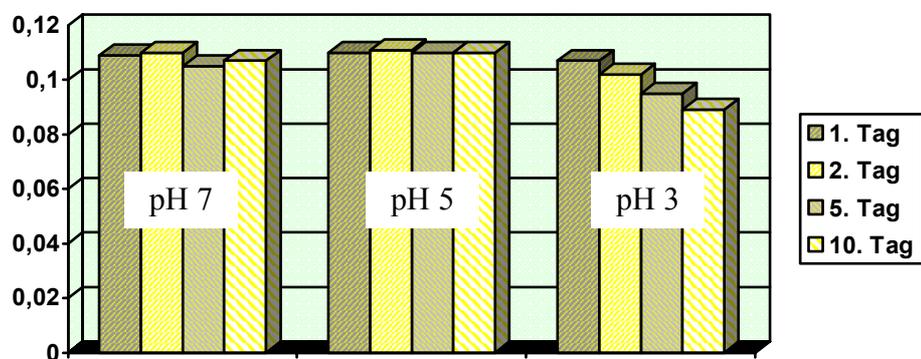


Abbildung 35 Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe von IC vor Zugabe von L-Homocystein

3.6.3 Versuch 12: D-Homocystein-Thiolacton

Die Messergebnisse für die mit der Substanz D-Homocystein-Thiolacton durchgeführten Versuche sind in den Tabellen 38 – 40 zu finden.

Die Abbildungen 36 – 38 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,102 | 0,103 | 0,103 |
| nach 1 Tag | 0,089 | 0,095 | 0,096 |
| nach 5 Tagen | 0,074 | 0,087 | 0,082 |
| nach 10 Tagen | 0,055 | 0,070 | 0,064 |

Tab. 38 Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,111 | 0,102 | 0,102 |
| nach 1 Tag | 0,092 | 0,089 | 0,098 |
| nach 5 Tagen | 0,071 | 0,076 | 0,104 |
| nach 10 Tagen | 0,061 | 0,054 | 0,068 |

Tab. 39 Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton

| Zugabe der IC vor Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,101 | 0,100 | 0,102 |
| nach 1 Tag | 0,087 | 0,087 | 0,096 |
| nach 5 Tagen | 0,069 | 0,079 | 0,091 |
| nach 10 Tagen | 0,055 | 0,071 | 0,072 |

Tab. 40 Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton

Diagramme für die Testsubstanz D-Homocystein-Thiolacton

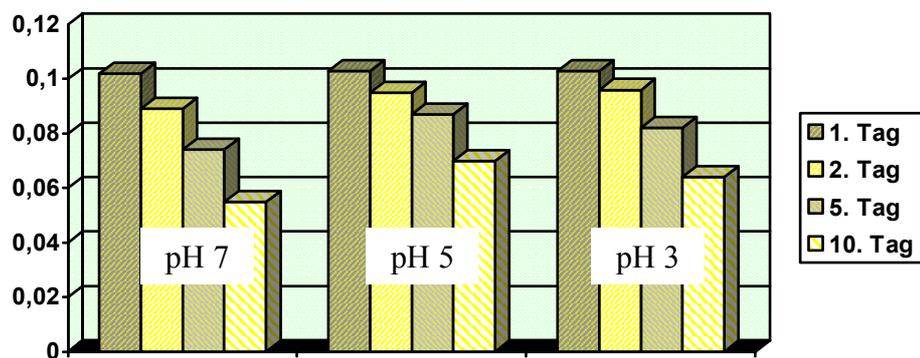


Abbildung 36 Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von IC

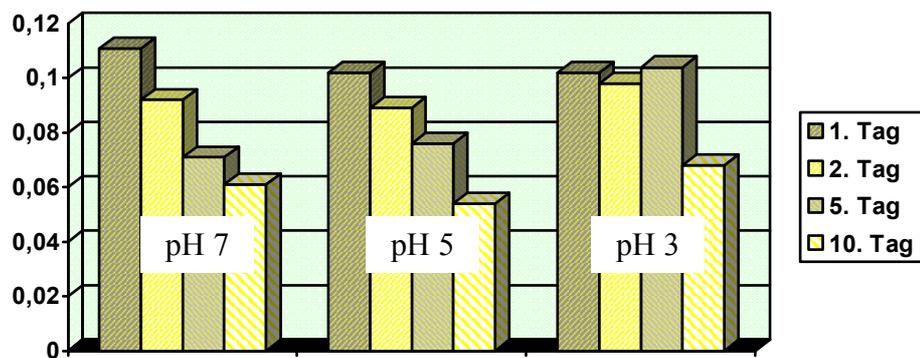


Abbildung 37 Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC nach Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton

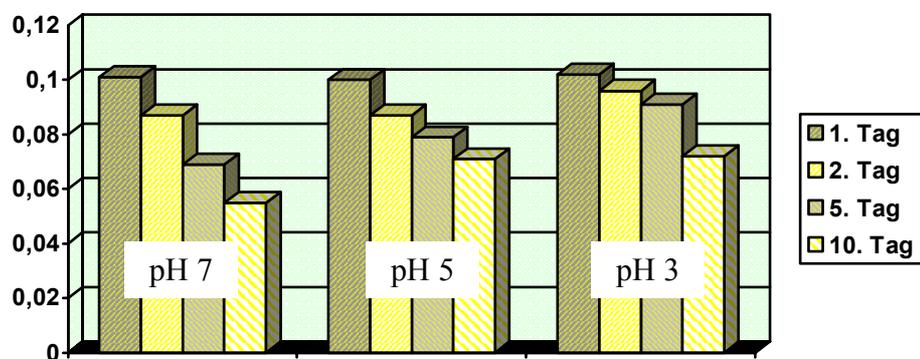


Abbildung 38 Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC vor Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton

3.6.4 Versuch 13: L-Homocystein-Thiolacton

Die Tabellen 41 – 43 zeigen die Messergebnisse für die mit der Substanz L-Homocystein-Thiolacton durchgeführten Versuche.

In den Abbildungen 39 – 41 finden sich die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,102 | 0,102 | 0,103 |
| nach 1 Tag | 0,087 | 0,095 | 0,094 |
| nach 5 Tagen | 0,077 | 0,083 | 0,086 |
| nach 10 Tagen | 0,070 | 0,079 | 0,084 |

Tab. 41 Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,099 | 0,103 | 0,103 |
| nach 1 Tag | 0,082 | 0,090 | 0,098 |
| nach 5 Tagen | 0,072 | 0,086 | 0,091 |
| nach 10 Tagen | 0,066 | 0,085 | 0,089 |

Tab. 42 Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton

| Zugabe der IC vor Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,103 | 0,101 | 0,105 |
| nach 1 Tag | 0,088 | 0,087 | 0,097 |
| nach 5 Tagen | 0,078 | 0,084 | 0,091 |
| nach 10 Tagen | 0,079 | 0,086 | 0,088 |

Tab. 43 Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton

Diagramme für die Testsubstanz L-Homocystein-Thiolacton

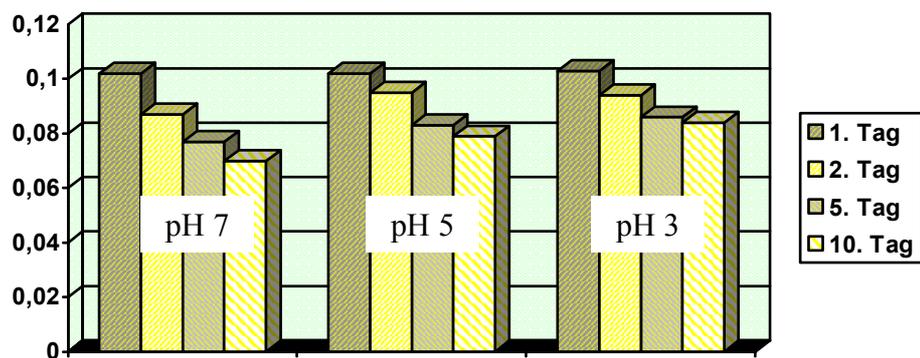


Abbildung 39 Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von IC

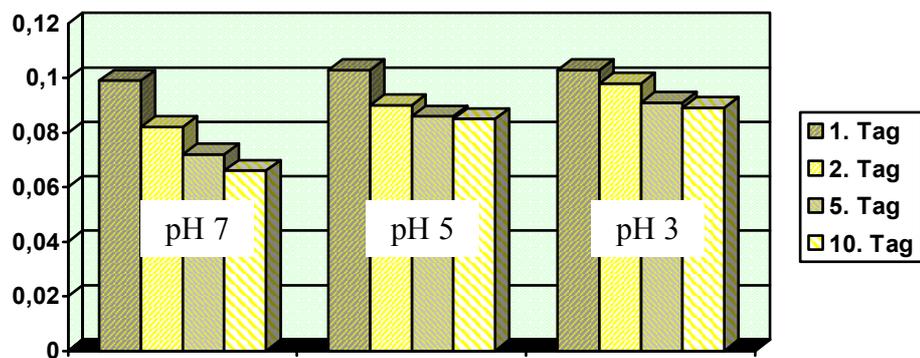


Abbildung 40 Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC nach Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton

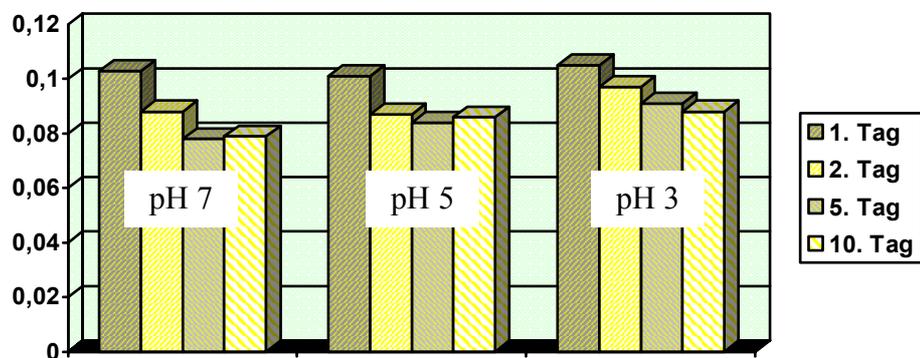


Abbildung 41 Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC vor Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton

3.6.5 Beschreibung der Ergebnisse

Die Versuche mit Homocystein und Homocystein-Thiolacton zeigen einige Auffälligkeiten: Zum einen eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Chiralität beim Homocystein, zum anderen einen unerwarteten Verlauf bei DL-Homocystein, bei dem es z.T. zu einem Anstieg der Extinktionswerte bei niedrigen Ausgangswerten kommt. Homocystein-Thiolacton zeigt ebenfalls eine Abhängigkeit von der Chiralität des Moleküls, insgesamt verlaufen die Änderungen hier aber eher langsam.

Versuch 10 mit DL-Homocystein zeigt einen paradoxen Verlauf. Die Extinktionswerte liegen bei Versuchsbeginn sehr niedrig und steigen, zumindest bei pH 7, bis zum zehnten Tag hin auf den in anderen Versuchen anzutreffenden Anfangswert. Die Versuche bei pH-Werten von 3 und 5 zeigen dagegen keine wesentlichen Änderungen der Ausgangswerte.

In Versuch 11 mit L-Homocystein treten Immunkomplexe eher als Präzipitationshemmnis auf. Während ohne die Zugabe von Immunkomplexen ein leichtes Absinken der Extinktionswerte zu erkennen ist, das bei pH 3 am stärksten ausgeprägt ist, fällt diese mit Immunkomplexen wesentlich geringer aus. Werden die Immunkomplexe vor dem Homocystein zugegeben, tritt lediglich bei pH 5 eine kleine, meßbare Präzipitation auf. Bei den Versuchen mit Zugabe der Immunkomplexe nach Homocystein-Zugabe deutet sich dagegen bei pH 3 eine Extinktionsverminderung an.

D-Homocystein-Thiolacton (Versuch 12) bewirkt einen geringen, sehr langsam ablaufenden Rückgang der Cholesterinwerte im Überstand. Dabei ist weder eine Abhängigkeit vom pH-Wert des Ansatzes, noch von der Reihenfolge der Zugabe von Immunkomplexen zu erkennen.

Versuch 13 mit L-Homocystein-Thiolacton zeigt sehr ähnliche Ergebnisse wie Versuch 12, wobei die Änderungen noch geringer ausfallen als mit D-Homocystein-Thiolacton.

3.7 Untersuchungen zur Plasmadestabilisierung durch Poly-L-Ornithin in verschiedenen Molekülgrößen

Ornithin ist ein Zwischenprodukt bei der Harnstoffbildung im Harnstoffzyklus. Seine Synthese beginnt mit L-Glutaminsäure, die – katalysiert von einer Aminosäure-Acetyltransferase – in N-Acetylglutaminsäure umgewandelt wird. Die Acetylglutamat-Kinase katalysiert die folgende Phosphorylierung, es entsteht N-Acetyl- γ -Glutamylphosphat, welches im nächsten Schritt zu N-Acetylglutaminsäure- γ -semialdehyd umgewandelt wird. Diese Reaktion katalysiert die N-Acetyl- γ -Glutamylphosphat-Reduktase. Nach einer Transaminierung, die von der Acetylornithin-Transaminase katalysiert wird, entsteht α -N-Acetylornithin. Ornithin entsteht anschließend in zwei alternativen Wegen, die von der Glutamat-Acetyl-Transferase bzw. der Acetylornithin-Deacetylase katalysiert werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche, die mit der Aminosäure Ornithin durchgeführt wurden, dargestellt. Durch die Versuche sollte untersucht werden, ob sich durch die Variation des Molekulargewichtes der Polypeptide eine Änderung im Verhalten ergab.

Versuch 14 wurde mit Poly-L-Ornithin mit einem Molekulargewicht von 5 000 – 15 000 Da durchgeführt, die Versuche 15 und 16 mit den Molekulargewichten 30 000 – 70 000 Da bzw. 100 000 – 200 000 Da.

3.7.1 Versuch 14: Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000}

In den Tabellen 44 – 46 sind die Messergebnisse zu finden, die mit der Substanz Poly-L-Ornithin mit der Molekülgröße 5000 – 15000 Da erzielt wurden.

Die Abbildungen 42 – 44 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,115 | 0,115 | 0,115 |
| nach 1 Tag | 0,084 | 0,106 | 0,115 |
| nach 5 Tagen | 0,073 | 0,093 | 0,112 |
| nach 10 Tagen | 0,064 | 0,085 | 0,113 |

Tab. 44 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,120 | 0,115 | 0,114 |
| nach 1 Tag | 0,049 | 0,065 | 0,112 |
| nach 5 Tagen | 0,046 | 0,050 | 0,113 |
| nach 10 Tagen | 0,039 | 0,047 | 0,112 |

Tab. 45 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,122 | 0,116 | 0,116 |
| nach 1 Tag | 0,048 | 0,063 | 0,111 |
| nach 5 Tagen | 0,046 | 0,058 | 0,115 |
| nach 10 Tagen | 0,038 | 0,051 | 0,113 |

Tab. 46 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$

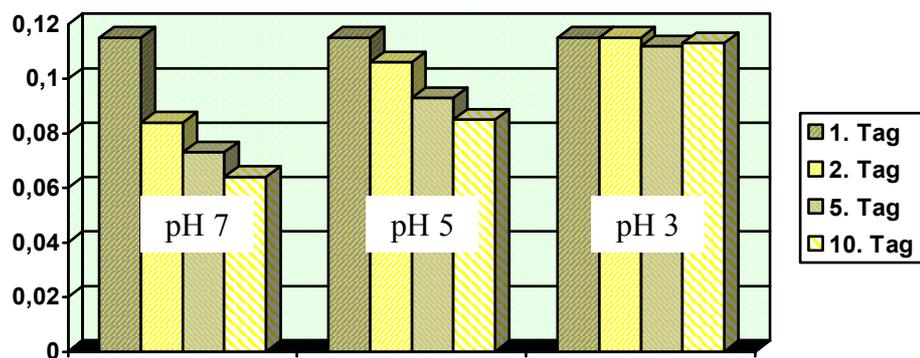


Abbildung 42 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ ohne Zugabe von IC

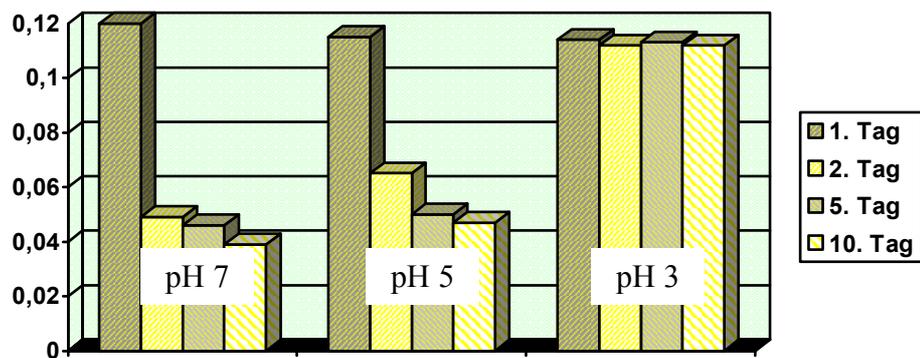


Abbildung 43 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$

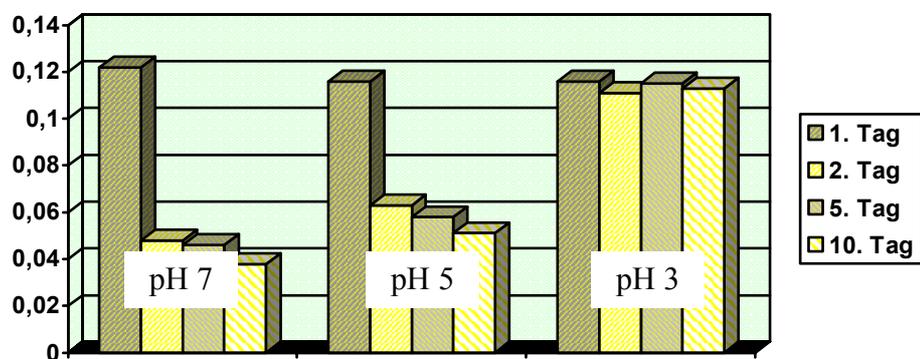


Abbildung 44 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$

3.7.2 Versuch 15: Poly-L-Ornithin_{30 000 - 70 000}

Die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-L-Ornithin mit der Molekülgröße 30 000 - 70 000 Da durchgeführten Versuche sind in den Tabellen 47 – 49 eingetragen.

Die Abbildungen 45 – 47 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,193 | 0,193 | 0,168 |
| nach 1 Tag | 0,084 | 0,083 | 0,160 |
| nach 5 Tagen | 0,061 | 0,067 | 0,147 |
| nach 10 Tagen | 0,052 | 0,059 | 0,135 |

Tab. 47 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{30 000 - 70 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,199 | 0,203 | 0,188 |
| nach 1 Tag | 0,069 | 0,074 | 0,186 |
| nach 5 Tagen | 0,048 | 0,051 | 0,168 |
| nach 10 Tagen | 0,035 | 0,031 | 0,164 |

Tab. 48 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{30 000 - 70 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Ornithin_{30 000 - 70 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,218 | 0,209 | 0,187 |
| nach 1 Tag | 0,074 | 0,070 | 0,176 |
| nach 5 Tagen | 0,048 | 0,052 | 0,160 |
| nach 10 Tagen | 0,044 | 0,033 | 0,155 |

Tab. 49 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{30 000 - 70 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Ornithin_{30 000 - 70 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000

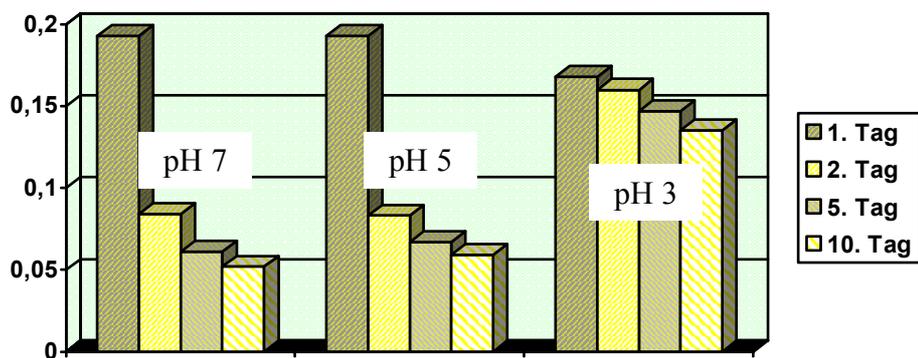


Abbildung 45 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000 ohne Zugabe von IC

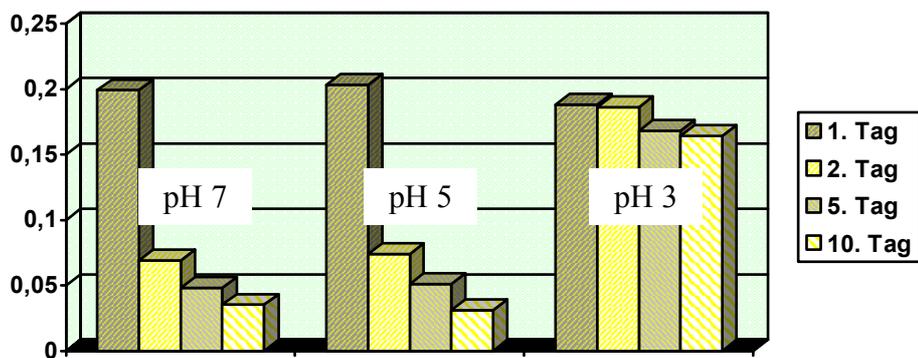


Abbildung 46 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000

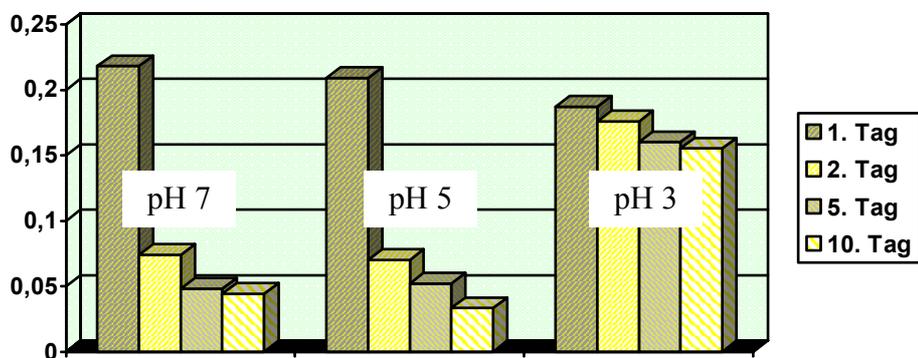


Abbildung 47 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin 30 000 - 70 000

3.7.3 Versuch 16: Poly-L-Ornithin_{100 000 - 200 000}

In den Tabellen 50 – 52 finden sich die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-L-Ornithin mit der Molekülgröße 100 000 - 200 000 Da durchgeführten Versuche.

Die Abbildungen 48 – 50 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,174 | 0,215 | 0,153 |
| nach 1 Tag | 0,053 | 0,169 | 0,149 |
| nach 5 Tagen | 0,040 | 0,122 | 0,143 |
| nach 10 Tagen | 0,015 | 0,119 | 0,141 |

Tab. 50 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{100 000 - 200 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,119 | 0,171 | 0,146 |
| nach 1 Tag | 0,018 | 0,052 | 0,145 |
| nach 5 Tagen | 0,013 | 0,035 | 0,138 |
| nach 10 Tagen | 0,012 | 0,040 | 0,136 |

Tab. 51 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{100 000 - 200 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Ornithin_{100 000 - 200 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,255 | 0,335 | 0,199 |
| nach 1 Tag | 0,010 | 0,246 | 0,198 |
| nach 5 Tagen | 0,006 | 0,158 | 0,196 |
| nach 10 Tagen | 0,008 | 0,206 | 0,196 |

Tab. 52 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{100 000 - 200 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Ornithin_{100 000 - 200 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000

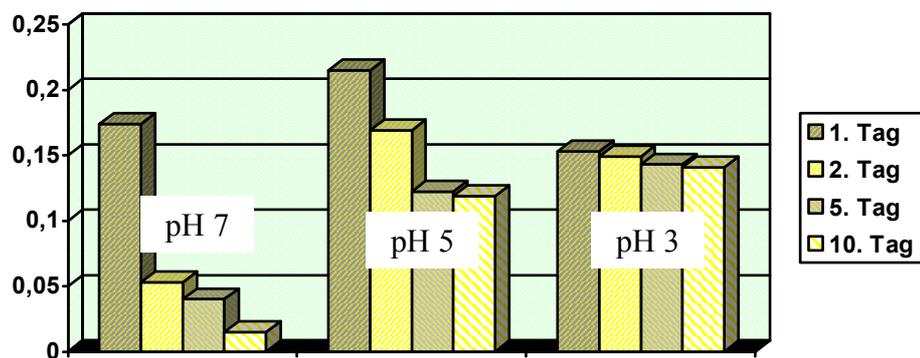


Abbildung 48 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000 ohne Zugabe von IC

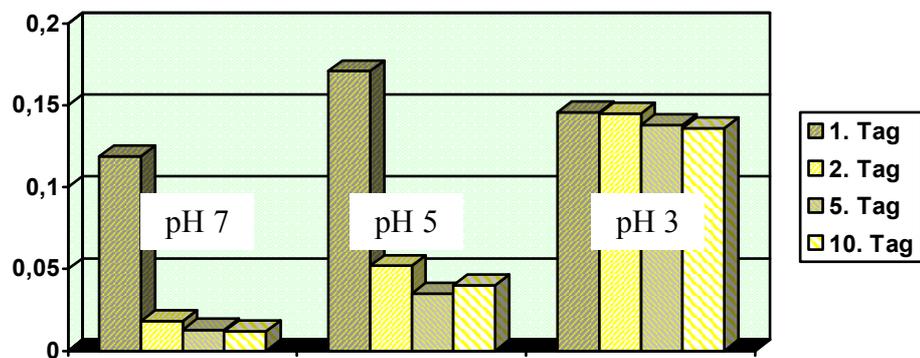


Abbildung 49 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000

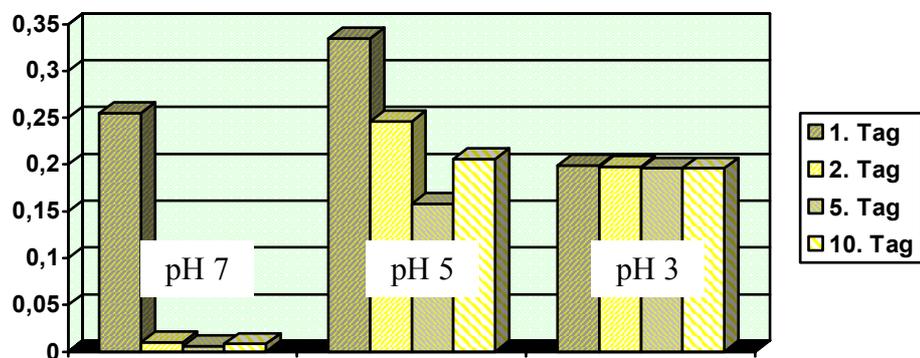


Abbildung 50 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin 100 000 - 200 000

3.7.4 Beschreibung der Ergebnisse

Die Versuche mit Ornithin zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Präzipitation von der Molekülgröße der Polypeptidketten, sowie eine Beschleunigung der Präzipitation durch Immunkomplexe.

In Versuch 14 mit Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ kommt es, wie auch in den folgenden Versuchen, bei pH 3 zu keiner relevanten Präzipitation. Ohne die Beigabe von Immunkomplexen ist die Präzipitation hier auch bei pH 5 und pH 7 sehr gering. Die Zugabe von Immunkomplexen führt unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe innerhalb eines Tages zur Abnahme der Extinktionswerte auf ca. 50 % der Ausgangswerte. Die nach einem Tag erreichten Werte verändern sich in den folgenden Messungen nur noch unwesentlich.

Poly-L-Ornithin $30\ 000 - 70\ 000$ weist bei pH 7 und pH 5 bereits eine deutlich stärkere Extinktionsabnahme auf als Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ (Versuch 15). Bei pH 3 kommt es auch hier zu keiner relevanten Änderung. Durch Immunkomplexe wird die Präzipitation beschleunigt und auch über die gesamten zehn Tage fortgeführt.

Bei Poly-L-Ornithin $100\ 000 - 200\ 000$ findet die höchste Extinktionsabnahme statt, und zwar bei einem pH-Wert von 7 und mit Zugabe von Immunkomplexen nach Zugabe der Testsubstanz. Es zeigt sich auch eine deutlichere pH-Abhängigkeit. Bei pH 5 ist die Präzipitation um einiges geringer, bei pH 3 findet keine Präzipitation statt. Ohne Zugabe von Immunkomplexen ist bei pH 7 ebenfalls noch eine kräftige Präzipitation vorhanden. Bei Immunkomplezzugabe kommt es aber bereits nach einem Tag zu einer Abnahme der Extinktion bis auf nahezu null, was bedeutet, dass im Überstand kaum mehr Cholesterin nachzuweisen ist.

3.8 Untersuchungen zum Verhalten cholesterinhaltiger Plasmabestandteile in Interaktion mit den Substanzen Glycin, Hydroxyprolin, Tryptophan, Lysozym und Glutamin

Neben den bereits dargestellten Versuchen wurden auch einige Einzelversuche mit anderen Substanzen durchgeführt, und zwar mit den Substanzen Poly-Glycin, Poly-L-Hydroxyprolin, Poly-DL-Tryptophan, Lysozym und Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin.

Glycin ist als einfachste proteinogene Aminosäure Baustein fast aller Proteine, besonders des Kollagens. Es bildet sich entweder aus CO₂, Ammoniak und einem von N⁵, N¹⁰-Tetrahydrofolsäure gelieferten C₁-Körper unter Vermittlung der Glycin-Synthase oder aus Serin durch Übertragung eines C₁-Restes auf Tetrahydrofolsäure. Der Abbau von Glycin erfolgt auf dem umgekehrten Weg über Serin. Glycin ist nicht optisch aktiv, da zwei gleiche Substituenten am α -Kohlenstoffatom gebunden sind.

Hydroxyprolin ist eine nur in bestimmten Proteinen (z.B. Kollagen) auftretende Aminosäure, die durch Hydroxylierung von Prolin durch eine Hydroxylase gebildet wird, die Eisen enthält und Vitamin C-abhängig ist.

Tryptophan zählt aufgrund der β -Indolyl-Seitenkette zu den aromatischen und hydrophoben Aminosäuren. Da der menschliche Organismus Tryptophan nicht selbst aufbauen kann, wird es auch zu den essentiellen Aminosäuren gerechnet. Durch Abbau von Tryptophan entstehen mehrere stoffwechselfysiologisch wichtige Metaboliten. Eingeleitet wird der Abbau durch die Tryptophan-Pyrrolase-katalysierte, oxidative Spaltung zu Formyl-Kynurenin, das über Kynurenin, Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Chinolinsäure zu Nikotinsäure und NAD bzw. zu den Ommochromen umgewandelt werden kann. Ferner können sich aus Tryptophan das Tryptamin durch Decarboxylierung, das pflanzliche Hormon Indol-3-Essigsäure, Serotonin und Melatonin bilden.

Lysozym ist ein weitverbreitetes Enzym, durch das die Zellwand besonders von grampositiven Bakterien aufgelöst wird, indem es die Hydrolyse von Murein an der glykosidischen Bindung zwischen den N-Acetylmuraminsäure- und N-Acetylglucosamin-Einheiten katalysiert, wodurch es zur Lyse von Bakterien kommt. Auch glykosidische Bindungen von Chitin

werden von Lysozym hydrolysiert. Lysozym kommt unter anderem in Körperflüssigkeiten wie Speichel, Tränen, Nasenschleim und im Eiklar (Hühnerei) vor, aber auch in Pflanzen und Bakterien. Durch seine bakteriolytischen Eigenschaften wirkt Lysozym in Gewebe und Körperflüssigkeiten als Schutz vor bakterieller Infektion. Lysozym ist aus 129 Aminosäuren aufgebaut, deren komplizierte, u.a. durch 4 Disulfidbrücken und viele Wasserstoffbrücken zusammengehaltene dreidimensionale Struktur durch Röntgenstrukturanalyse so genau bekannt ist, daß die Zuordnung des aktiven Zentrums und die Enzym-Substrat-Interaktion bis zu atomaren Einzelheiten verstanden sind. Wie bei anderen hydrolytisch wirksamen Enzymen wird auch die dreidimensionale Struktur des Lysozyms durch einen Spalt, in dem das aktive Zentrum liegt, in zwei Hälften geteilt.

Glutamin ist als proteinogene Aminosäure Baustein fast aller Proteine. In freier Form spielt es im Stickstoffmetabolismus eine zentrale Rolle. Durch Übertragung des Amidstickstoffs wirkt Glutamin als Amino- bzw. Stickstoffgruppendonator in vielen synthetischen Reaktionen, z.B. bei der Bildung von Cytosin, Glucosamin, Guanin, Histidin, Tryptophan sowie für die N-3- und N-9-Stickstoffe bei der Purin-Synthese. Auch die Bildung von Carbamylphosphat erfolgt teilweise durch Umsetzung der Amidgruppe von Glutamin. Glutamin bildet sich unter ATP-Verbrauch aus Glutamat und Ammoniak. Es ist daher vielfach die Transport-, Entgiftungs- bzw. Speicherform von Ammoniak. Der Abbau erfolgt durch hydrolytische Spaltung zu Glutamat und Ammoniak unter der katalytischen Wirkung des Enzyms Glutaminase.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche dargestellt, die mit den oben beschriebenen Substanzen durchgeführt wurden.

Mit Hilfe der Versuche sollte untersucht werden, ob sich durch die unterschiedlichen Eigenschaften der genannten Substanzen wesentliche Unterschiede in Bezug auf die Präzipitation von modifizierten LDL-Partikeln ergeben und ob andererseits diese LDL-Partikel durch die genannten Substanzen so modifiziert werden, dass sich eine Änderung im Hinblick auf das Verhalten gegenüber Immunkomplexen und pH-Wert-Änderung ergeben.

3.8.1 Versuch 17: Poly-Glycin_{2 000 - 5 000}

Die Tabellen 53 – 55 zeigen die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-Glycin mit der Molekülgröße 2000 - 5000 Da durchgeführten Versuche.

In den Abbildungen 51 – 53 sind die Ergebnisse in graphischer Form dargestellt.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,116 | 0,115 | 0,115 |
| nach 1 Tag | 0,113 | 0,113 | 0,110 |
| nach 5 Tagen | 0,111 | 0,107 | 0,106 |
| nach 10 Tagen | 0,108 | 0,099 | 0,101 |

Tab. 53 Meßergebnisse für Poly-Glycin_{2 000 - 5 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,115 | 0,116 | 0,115 |
| nach 1 Tag | 0,114 | 0,109 | 0,108 |
| nach 5 Tagen | 0,112 | 0,107 | 0,107 |
| nach 10 Tagen | 0,108 | 0,090 | 0,108 |

Tab. 54 Meßergebnisse für Poly-Glycin_{2 000 - 5 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-Glycin_{2 000 - 5 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,118 | 0,112 | 0,116 |
| nach 1 Tag | 0,112 | 0,109 | 0,109 |
| nach 5 Tagen | 0,113 | 0,106 | 0,111 |
| nach 10 Tagen | 0,113 | 0,097 | 0,102 |

Tab. 55 Meßergebnisse für Poly-Glycin_{2 000 - 5 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-Glycin_{2 000 - 5 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-Glycin 2 000 - 5 000

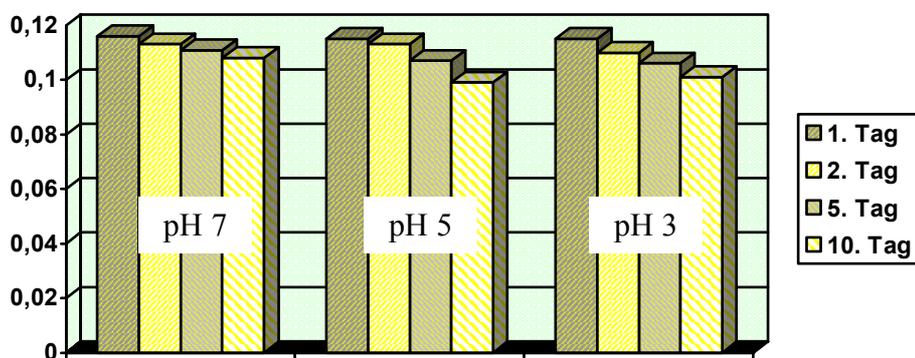


Abbildung 51 Meßergebnisse für Poly-Glycin 2 000 - 5 000 ohne Zugabe von IC

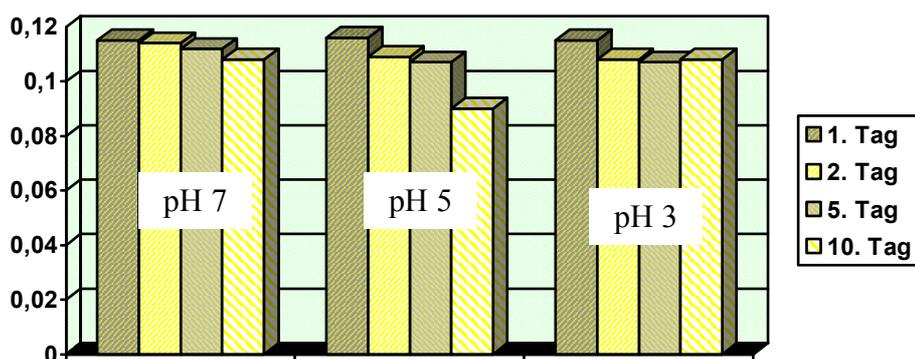


Abbildung 52 Meßergebnisse für Poly-Glycin 2 000 - 5 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-Glycin 2 000 - 5 000

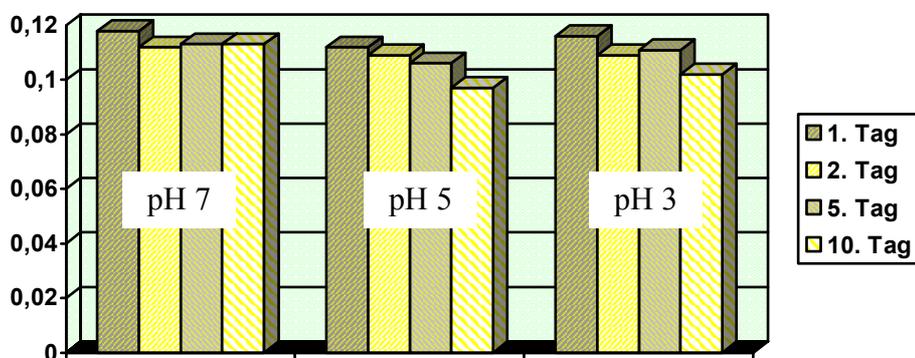


Abbildung 53 Meßergebnisse für Poly-Glycin 2 000 - 5 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-Glycin 2 000 - 5 000

3.8.2 Versuch 18: Poly-L-Hydroxyprolin_{5 000 - 20 000}

Die Versuchsergebnisse für die mit der Substanz Poly-L-Hydroxyprolin mit der Molekülgröße 5000 - 20000 Da sind in den Tabellen 56 – 58 durchgeführten Versuche eingetragen.

Die Abbildungen 54 – 56 zeigen die Ergebnisse in graphischer Form.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,113 | 0,113 | 0,109 |
| nach 1 Tag | 0,114 | 0,114 | 0,110 |
| nach 5 Tagen | 0,111 | 0,112 | 0,101 |
| nach 10 Tagen | 0,108 | 0,105 | 0,073 |

Tab. 56 Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin_{5 000 - 20 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,109 | 0,111 | 0,111 |
| nach 1 Tag | 0,112 | 0,116 | 0,114 |
| nach 5 Tagen | 0,108 | 0,115 | 0,111 |
| nach 10 Tagen | 0,101 | 0,104 | 0,091 |

Tab. 57 Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin_{5 000 - 20 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin_{5 000 - 20 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,112 | 0,114 | 0,108 |
| nach 1 Tag | 0,114 | 0,115 | 0,110 |
| nach 5 Tagen | 0,109 | 0,113 | 0,104 |
| nach 10 Tagen | 0,107 | 0,108 | 0,078 |

Tab. 58 Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin_{5 000 - 20 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin_{5 000 - 20 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-L-Hydroxyprolin $5\ 000 - 20\ 000$

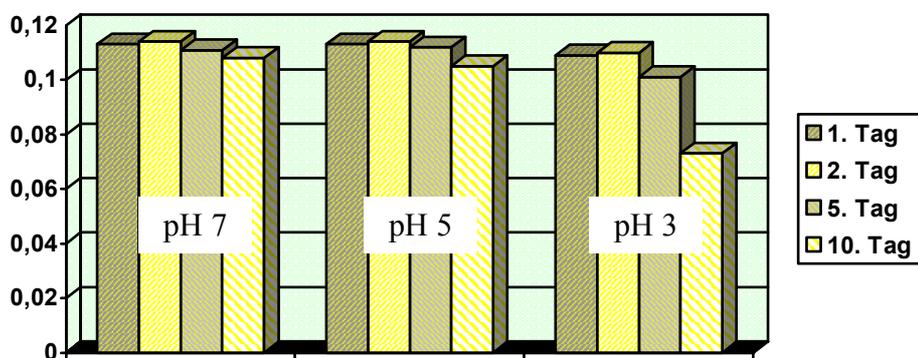


Abbildung 54 Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin $5\ 000 - 20\ 000$ ohne Zugabe von IC

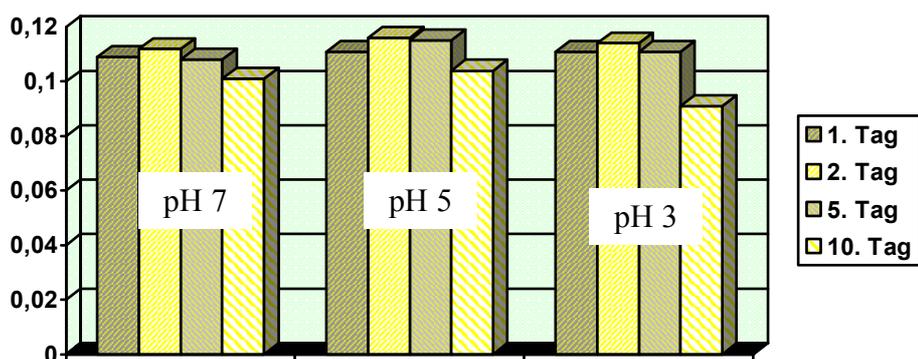


Abbildung 55 Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin $5\ 000 - 20\ 000$ mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin $5\ 000 - 20\ 000$

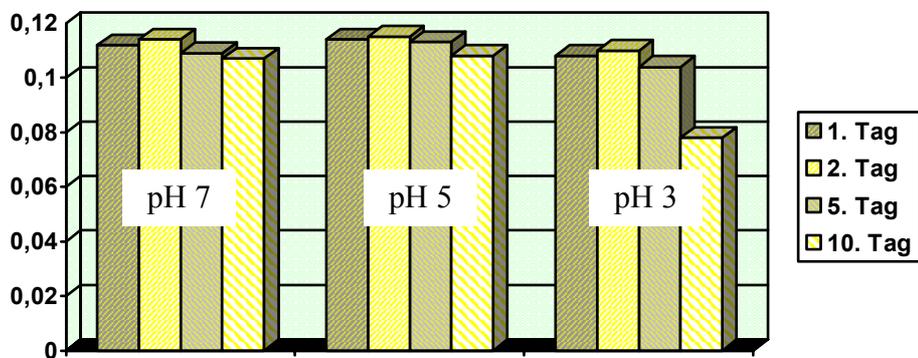


Abbildung 56 Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin $5\ 000 - 20\ 000$ mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin $5\ 000 - 20\ 000$

3.8.3 Versuch 19: Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000}

In den Tabellen 59 – 61 sind die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-DL-Tryptophan mit der Molekülgröße 5000 - 15000 Da durchgeführten Versuche eingetragen.

Die Abbildungen 57 – 59 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,110 | 0,105 | 0,107 |
| nach 1 Tag | 0,112 | 0,114 | 0,111 |
| nach 5 Tagen | 0,112 | 0,110 | 0,107 |
| nach 10 Tagen | 0,110 | 0,089 | 0,107 |

Tab. 59 Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,110 | 0,107 | 0,107 |
| nach 1 Tag | 0,113 | 0,104 | 0,111 |
| nach 5 Tagen | 0,110 | 0,103 | 0,108 |
| nach 10 Tagen | 0,104 | 0,092 | 0,110 |

Tab. 60 Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,110 | 0,107 | 0,106 |
| nach 1 Tag | 0,111 | 0,105 | 0,111 |
| nach 5 Tagen | 0,108 | 0,105 | 0,110 |
| nach 10 Tagen | 0,110 | 0,083 | 0,107 |

Tab. 61 Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-DL-Tryptophan $5\ 000 - 15\ 000$

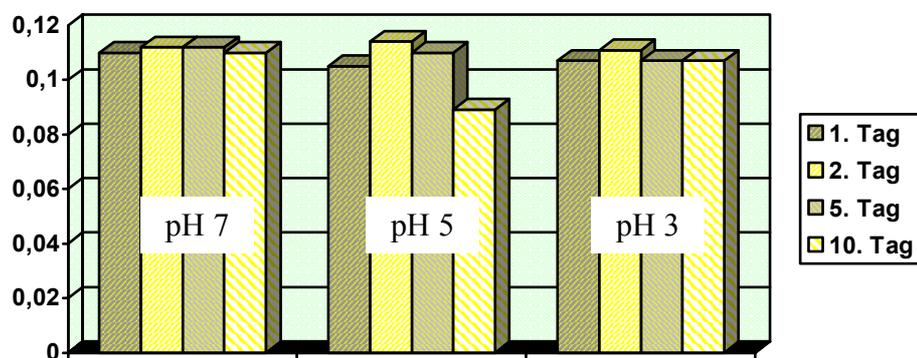


Abbildung 57 Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan $5\ 000 - 15\ 000$ ohne Zugabe von IC

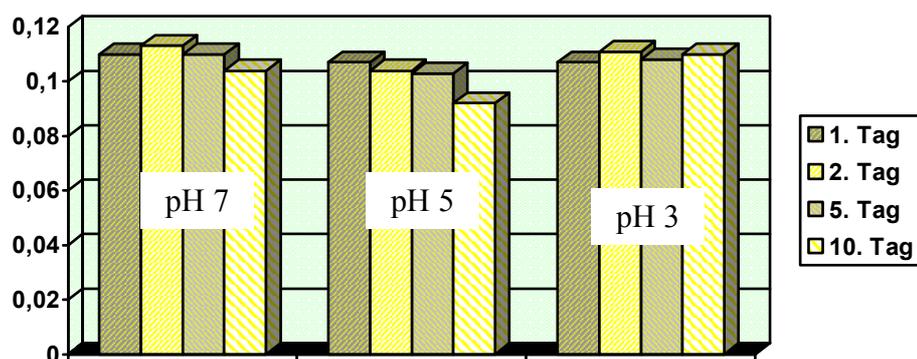


Abbildung 58 Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-DL-Tryptophan $5\ 000 - 15\ 000$

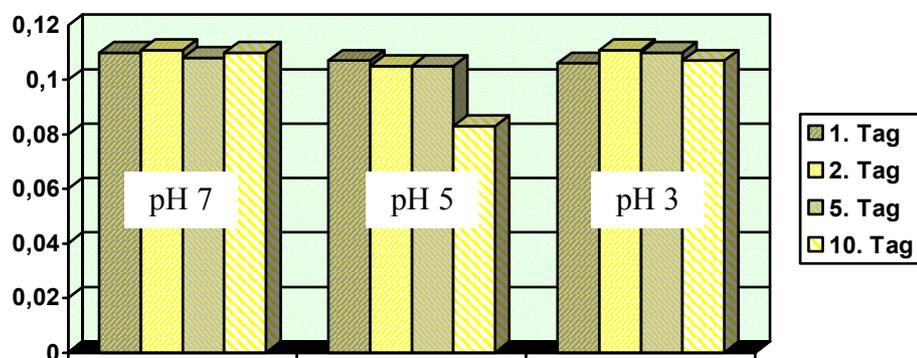


Abbildung 59 Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-DL-Tryptophan $5\ 000 - 15\ 000$

3.8.4 Versuch 20: Lysozym

Die Messergebnisse für die mit der Substanz Lysozym durchgeführten Versuche sind in den Tabellen 62 – 64 enthalten.

Die Abbildungen 60 – 62 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,103 | 0,102 | 0,101 |
| nach 1 Tag | 0,109 | 0,106 | 0,109 |
| nach 5 Tagen | 0,113 | 0,106 | 0,107 |
| nach 10 Tagen | 0,111 | 0,093 | 0,094 |

Tab. 62 Meßergebnisse für Lysozym ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Lysozym | | | |
|---------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,105 | 0,101 | 0,114 |
| nach 1 Tag | 0,107 | 0,103 | 0,122 |
| nach 5 Tagen | 0,106 | 0,101 | 0,118 |
| nach 10 Tagen | 0,102 | 0,086 | 0,100 |

Tab. 63 Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Lysozym

| Zugabe der IC vor Zugabe von Lysozym | | | |
|--------------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,103 | 0,105 | 0,104 |
| nach 1 Tag | 0,114 | 0,106 | 0,111 |
| nach 5 Tagen | 0,115 | 0,104 | 0,107 |
| nach 10 Tagen | 0,108 | 0,090 | 0,104 |

Tab. 64 Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Lysozym

Diagramme für die Testsubstanz Lysozym

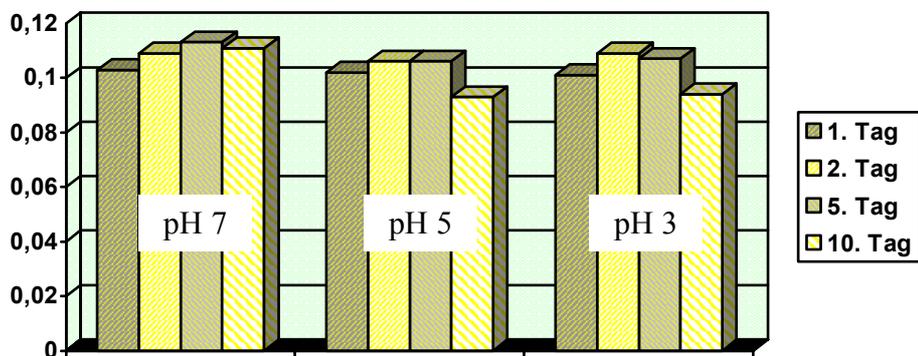


Abbildung 60 Meßergebnisse für Lysozym ohne Zugabe von IC

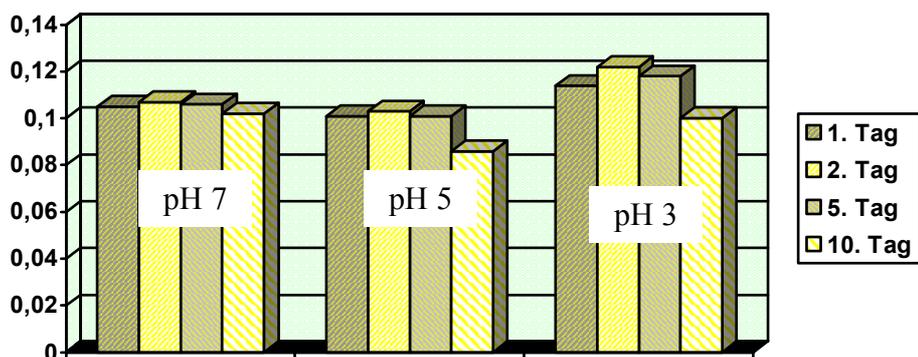


Abbildung 61 Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe von IC nach Zugabe von Lysozym

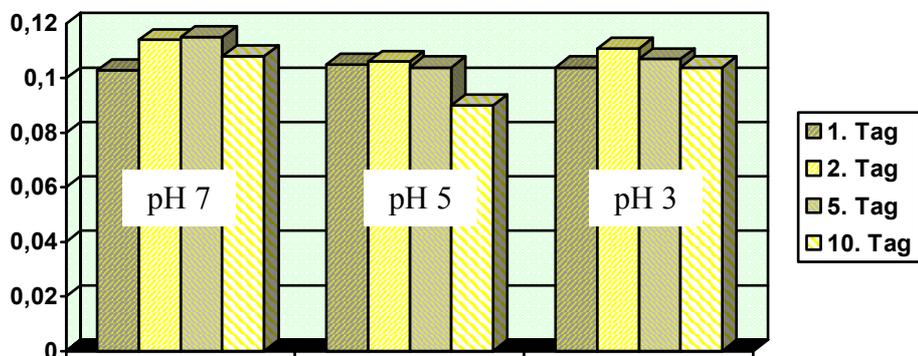


Abbildung 62 Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe von IC vor Zugabe von Lysozym

3.8.5 Versuch 21: Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000}

In den Tabellen 65 – 67 finden sich die Messergebnisse für die mit der Substanz Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin mit der Molekülgröße 15000 - 30000 Da durchgeführten Versuche.

Die Abbildungen 63 – 65 zeigen die Ergebnisse in graphischer Darstellung.

Meßergebnisse: Extinktionswerte von Serumcholesterin im Ansatzüberstand

| keine Zugabe von IC | | | |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,105 | 0,117 | 0,118 |
| nach 1 Tag | 0,103 | 0,117 | 0,117 |
| nach 5 Tagen | 0,104 | 0,115 | 0,114 |
| nach 10 Tagen | 0,102 | 0,112 | 0,114 |

Tab. 65 Meßergebnisse für Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen

| Zugabe der IC nach Zugabe von Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} | | | |
|--|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,124 | 0,119 | 0,118 |
| nach 1 Tag | 0,123 | 0,113 | 0,114 |
| nach 5 Tagen | 0,123 | 0,109 | 0,115 |
| nach 10 Tagen | 0,124 | 0,091 | 0,115 |

Tab. 66 Meßergebnisse für Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000}

| Zugabe der IC vor Zugabe von Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} | | | |
|---|--------------|--------------|--------------|
| | pH 7 | pH 5 | pH 3 |
| Ansatztag | 0,123 | 0,117 | 0,114 |
| nach 1 Tag | 0,121 | 0,116 | 0,113 |
| nach 5 Tagen | 0,122 | 0,111 | 0,112 |
| nach 10 Tagen | 0,121 | 0,103 | 0,098 |

Tab. 67 Meßergebnisse für Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000}

Diagramme für die Testsubstanz Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000

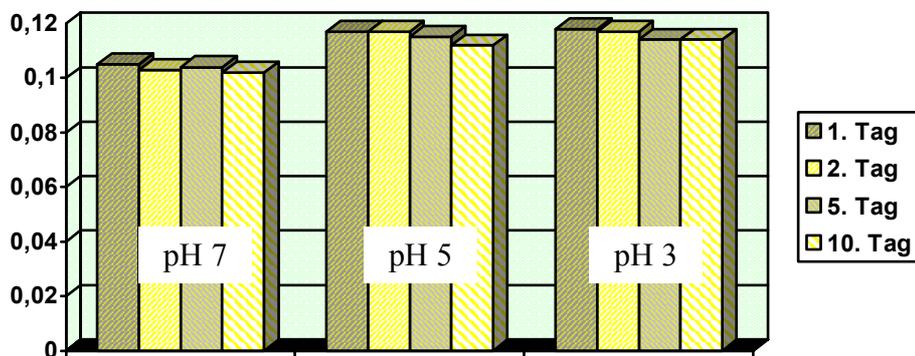


Abbildung 63 Meßergebnisse für Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000 ohne Zugabe von IC

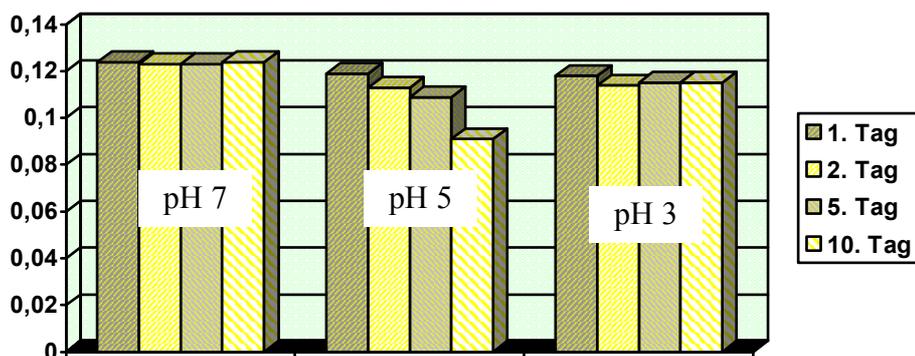


Abbildung 64 Meßergebnisse für Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000

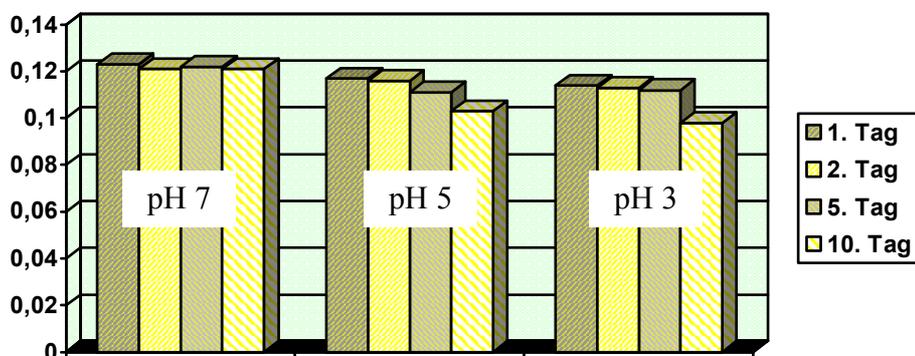


Abbildung 65 Meßergebnisse für Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin 15 000 - 30 000

3.8.6 Beschreibung der Ergebnisse

Die hier untersuchten Substanzen zeigen nur sehr geringe Tendenz zur Präzipitation.

Bei den Versuchen mit Poly-Glycin ist nur eine sehr geringe Extinktionsänderung zu erkennen, die über den gesamten Messzeitraum gleichmäßig verläuft und keine wesentlichen Unterschiede in den einzelnen Versuchsansätzen zeigt (Versuch 17). Die Zugabe von Immunkomplexen wirkt sich nicht auf die Extinktionswerte aus. Lediglich bei einem pH-Wert von fünf ist eine leichte Beeinflussung des Verlaufes im Sinne einer Präzipitationsbeschleunigung zu erkennen.

Ebenfalls von dem Vorhandensein von Immunkomplexen unbeeinflusste Ergebnisse zeigt Poly-L-Hydroxyprolin. Bei einem pH-Wert von drei ist allerdings eine zwischen dem fünften und dem zehnten Tag beschleunigte Präzipitation festzustellen (Versuch 18).

Mit Poly-DL-Tryptophan ist ebenfalls keine deutliche Änderung der Extinktionswerte zu erzielen. Bei einem pH-Wert von fünf zeigt sich in Versuch 19 am zehnten Tag eine geringe Extinktionsänderung. Durch Zugabe von Immunkomplexen verändern sich die Ergebnisse nicht.

Die Versuche mit Lysozym zeigen die Besonderheit, dass nach einem Tag und auch nach fünf Tagen die Extinktionswerte gering ansteigen (Versuch 20). Im weiteren Verlauf nehmen diese jedoch wieder ab und fallen bei einem pH-Wert von fünf bis zum zehnten Tag unter den Ausgangswert. Bei einem pH-Wert von drei ist ein Unterschied bei den Versuchen mit Immunkomplex-Zugabe zu erkennen. Während sich bei Zugabe der IC nach Zugabe von Lysozym keine Änderung ergibt, ist bei umgekehrtem Vorgehen eine geringe Extinktionswert-Erniedrigung vorhanden.

Poly-N⁵-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin bringt in Versuch 21 ähnlich geringe Veränderungen wie die vorher beschriebenen Substanzen. Extinktionswert-Änderungen sind bei pH-Werten von fünf und von drei erkennbar. Bei einem pH-Wert von drei bleibt die sowieso sehr geringe Präzipitation aus, wenn die Immunkomplexe vor der Testsubstanz mit entsprechender Inkubationszeit zugegeben werden.

3.9 Resuspensionsversuche mit Poly (Arg, Trp) 4:1 als Grundsubstanz

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte versucht werden, eine bereits statt gefundene Präzipitation wieder rückgängig zu machen, das heißt, das gebundene Cholesterin sollte wieder in Lösung gebracht werden. Dazu wurde ein Versuchsaufbau ausgewählt, bei dem es rasch zu einer Verminderung der Extinktionswerte kam. Dieses System wurde mit dem Ansatz der Substanz Poly (Arg, Trp) 4:1 bei einem pH-Wert von fünf gefunden, welches in Versuch fünf untersucht wurde. Hier kam es bereits nach einem Tag zu einer starken Abnahme der Extinktionswerte, was auf eine starke Präzipitation hinweist.

Innerhalb der Resuspensionsversuche wurden nun, einen Tag nachdem der Versuchsaufbau zubereitet wurde, verschiedene Substanzen zu dem System gegeben und nach fünf und zehn Tagen wiederum die Extinktion einer Probe aus dem Überstand gemessen. Zur Kontrolle wurde einem gleichen System statt der gelösten Testsubstanz in gleicher Menge NaCl beigegeben. Die Versuche wurden außerdem noch insofern variiert, daß die Testsubstanz, bzw. das NaCl einmal nur langsam in die Lösung beigegeben wurde („ohne Mischen“) und einmal die Lösung nach Zugabe der Testsubstanz gemischt wurde („mit mischen“), so daß das Präzipitat aufgewirbelt und mit der Testsubstanz besser durchmischt wurde.

Die Versuche wurden sowohl mit als auch ohne Immunkomplexe nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| Arg / Trp | 100 | 100 | 100 | 100 |
| NHS | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IC | | | | |
| NaCl | 610 | 610 | 610 | 610 |
| CaCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 |
| MgCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 |
| HCl | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Testsubstanz | 100 | 100 | | |
| NaCl | | | 100 | 100 |

Tab. 68 Pipettierschema für die Versuche 22 – 30 ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| Arg / Trp | 100 | 100 | 100 | 100 |
| NHS | 100 | 100 | 100 | 100 |
| IC | 300 | 300 | 300 | 300 |
| NaCl | 310 | 310 | 310 | 310 |
| CaCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 |
| MgCl ₂ | 40 | 40 | 40 | 40 |
| HCl | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Testsubstanz | 100 | 100 | | |
| NaCl | | | 100 | 100 |

Tab. 69 Pipettierschema für die Versuche 22 – 30 mit Immunkomplexen

Für die beiden Versuchsansätze mit und ohne Immunkomplexe ist jeweils ein Pipettierschema angegeben. Jede Tabelle ist in zwei Spalten geteilt, bei der eine die Angaben für den Ansatz mit Zugabe der Testsubstanz enthält und eine Spalte die Angaben für den Ansatz, bei dem statt der Testsubstanz NaCl beigegeben wurde. Diese Spalten sind wiederum untergliedert in eine Durchführung mit Mischung der Lösung und in einen Teil ohne Mischung.

Als Testsubstanzen wurden Poly-DL-Alanin _{1 000 - 5 000}, Poly-Glycin _{2 000 - 5 000}, Poly-(α,β)-DL-Aspartic Acid _{2 000 - 10 000}, Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000}, Poly-L-Glutaminsäure _{2 000 - 15 000}, Poly-L-Glutaminsäure _{750 - 1 500}, Poly (Glu, Ala) 6:4, Poly-L-Tyrosin und Poly-L-Glutaminsäure _{3 000 - 15 000} ausgewählt.

Die Tabelle der Ergebnisse ist ebenso aufgebaut und zeigt die Extinktionswerte vor der Zugabe der Testsubstanzen, fünf Tage nach Zugabe der Substanz und zehn Tage nach Zugabe der Substanz. Die Werte vor Zugabe der Testsubstanz bzw. des NaCl dienen dabei als Referenzwerte für die nachfolgenden Messungen.

Im Anschluß an die Ergebnistabellen sind die Ergebnisse in graphischer Form dargestellt.

Die x-Achse zeigt dabei einerseits, ob die jeweilige Testsubstanz oder NaCl zugegeben wurde, und andererseits, ob der Probenansatz nach Zugabe geschüttelt wurde (+s), oder nicht (-s).

3.9.1 Versuch 22: Poly-DL-Alanin $1\,000 - 5\,000$

Die Tabellen 70 und 71 zeigen die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-DL-Alanin $1\,000 - 5\,000$.

Die Ergebnisse sind außerdem graphisch in den Abbildungen 66 und 67 dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,031 | 0,013 | 0,029 | 0,026 |
| 5. Tag | 0,005 | 0,026 | 0,009 | 0,010 |
| 10. Tag | 0,008 | 0,010 | 0,009 | 0,012 |

Tab. 70 Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin $1\,000 - 5\,000$ ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,025 | 0,019 | 0,021 | 0,024 |
| 5. Tag | 0,022 | 0,012 | 0,008 | 0,009 |
| 10. Tag | 0,008 | 0,007 | 0,008 | 0,006 |

Tab. 71 Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin $1\,000 - 5\,000$ mit Immunkomplexen

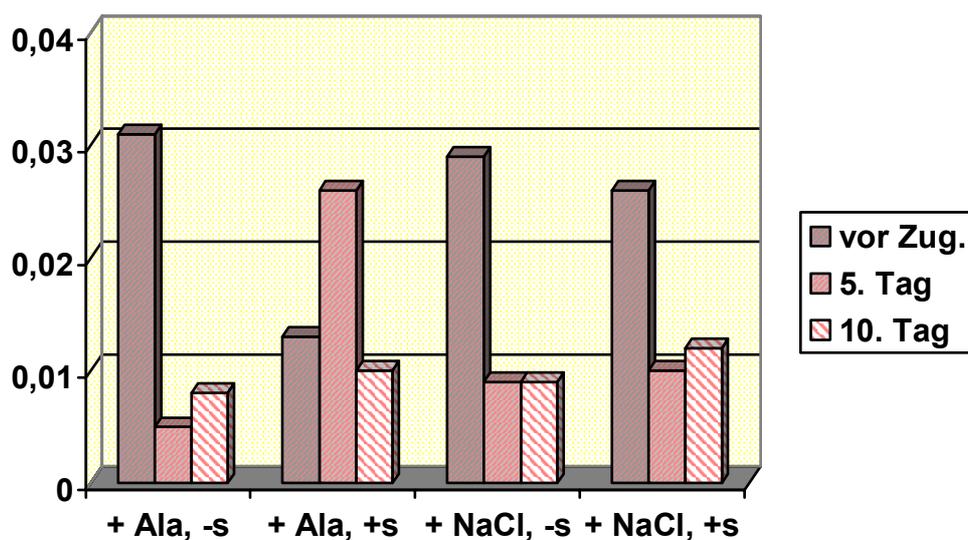


Abbildung 66 Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin $1\,000 - 5\,000$ ohne IC

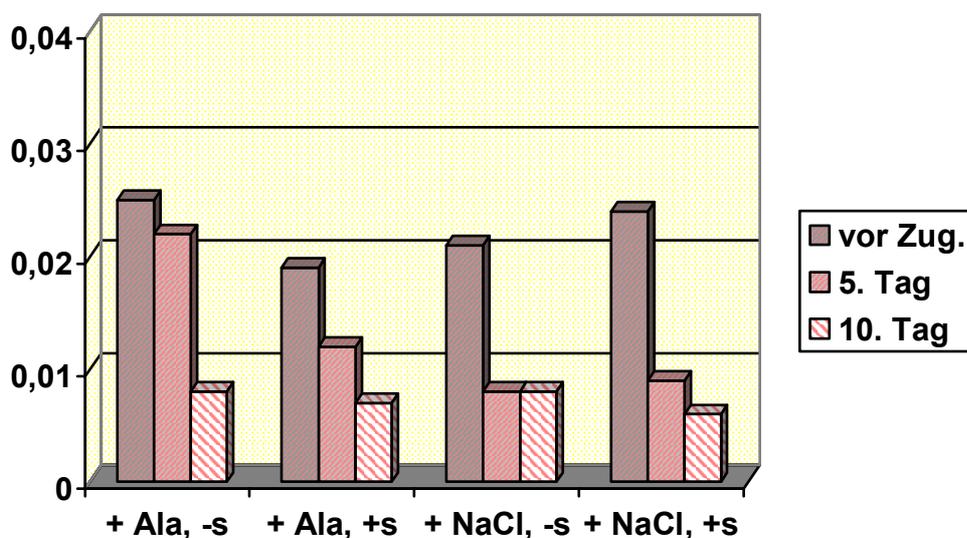


Abbildung 67 Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin ₁₀₀₀₋₅₀₀₀ mit IC

Ergebnisse

Mit der Substanz Poly-DL-Alanin ist bei Vorhandensein von Immunkomplexen keine Änderung des Versuchsablaufs zu erzielen. Fehlen allerdings die Immunkomplexe im Primäranatz, so ergab sich nach fünf Tagen ein höherer Extinktionswert als am ersten Messtag, wenn das Reagenzgefäß nach Zugabe der Testsubstanz durchmischt wurde. Diese Erhöhung ging allerdings bis zum zehnten Tag wieder zurück und ergab einen ähnlichen Wert wie bei den anderen Messungen dieses Versuches zu diesem Zeitpunkt.

Wenn die Testsubstanz nur zum Probenansatz gegeben wurde, ohne das Reagenzgefäß zu schütteln, ergab sich allerdings eine Präzipitationsbeschleunigung, die bis zum zehnten Tag wieder rückläufig war.

Bei Vorhandensein von Immunkomplexen verläuft die weitere Präzipitation nach Zugabe der Testsubstanz verzögert.

Insgesamt ist keine beständige Resuspension durch die Substanz Poly-DL-Alanin zu erreichen.

3.9.2 Versuch 23: Poly-Glycin_{2 000 - 5 000}

In den Tabellen 72 und 73 finden sich die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit Hilfe der Substanz Poly-Glycin_{2 000 - 5 000}.

Diese Ergebnisse sind zudem graphisch in den Abbildungen 68 und 69 dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,020 | 0,019 | 0,027 | 0,018 |
| 5. Tag | 0,007 | 0,014 | 0,018 | 0,013 |
| 10. Tag | 0,006 | 0,011 | 0,009 | 0,011 |

Tab. 72 Meßergebnisse für Poly-Glycin_{2 000 - 5 000} ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,024 | 0,033 | 0,023 | 0,021 |
| 5. Tag | 0,012 | 0,012 | 0,017 | 0,015 |
| 10. Tag | 0,007 | 0,011 | 0,008 | 0,011 |

Tab. 73 Meßergebnisse für Poly-Glycin_{2 000 - 5 000} mit Immunkomplexen

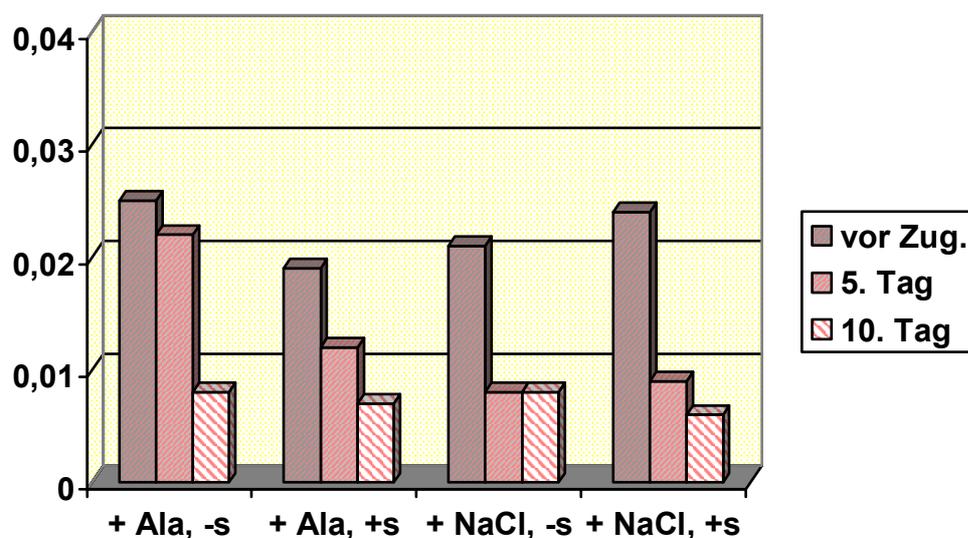


Abbildung 68 Meßergebnisse für Poly-Glycin_{2 000 - 5 000} ohne IC

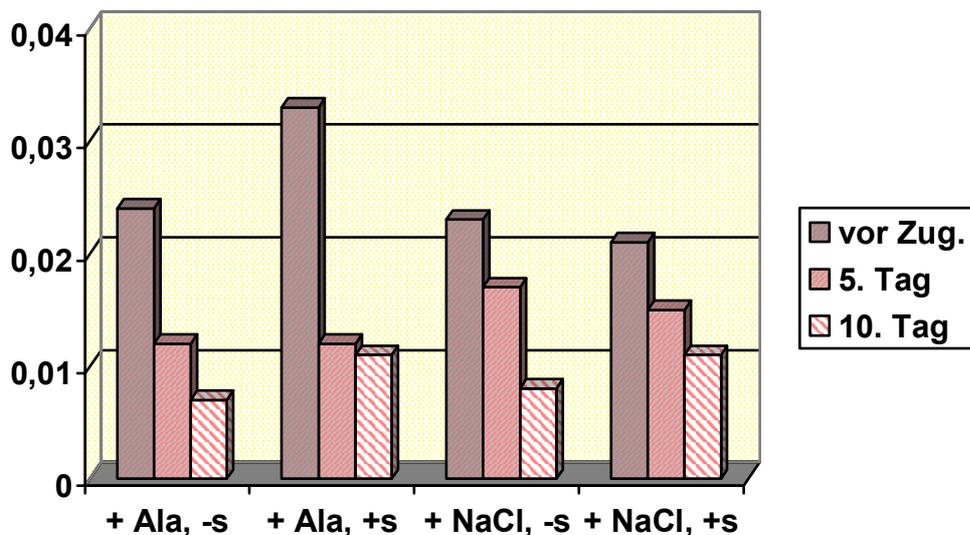


Abbildung 69 Meßergebnisse für Poly-Glycin 2 000 - 5 000 mit IC

Ergebnisse

Mit Poly-Glycin ist keine Resuspension des Cholesterins zu erreichen. Auch andere Beeinflussungen des Versuchsverlaufs sind nur in Ansätzen zu erkennen.

Bei dem Versuch mit Immunkomplexen im Ansatz verläuft die weitere Präzipitation etwas beschleunigt, wenn das Glycin einfach zum Grundansatz gegeben wird, ohne das Reagenzgefäß zu schütteln.

Sind Immunkomplexe vorhanden, läuft der Versuch weitgehend unbeeinflusst weiter.

3.9.3 Versuch 24: Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$

Die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$ sind in den Tabellen 74 und 75 dargestellt.

In den Abbildungen 70 und 71 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,041 | 0,037 | 0,035 | 0,039 |
| 5. Tag | 0,015 | 0,065 | 0,024 | 0,013 |
| 10. Tag | 0,015 | 0,030 | 0,007 | 0,012 |

Tab. 74 Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$ ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,037 | 0,036 | 0,036 | 0,031 |
| 5. Tag | 0,025 | 0,057 | 0,018 | 0,015 |
| 10. Tag | 0,015 | 0,038 | 0,006 | 0,011 |

Tab. 75 Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$ mit Immunkomplexen

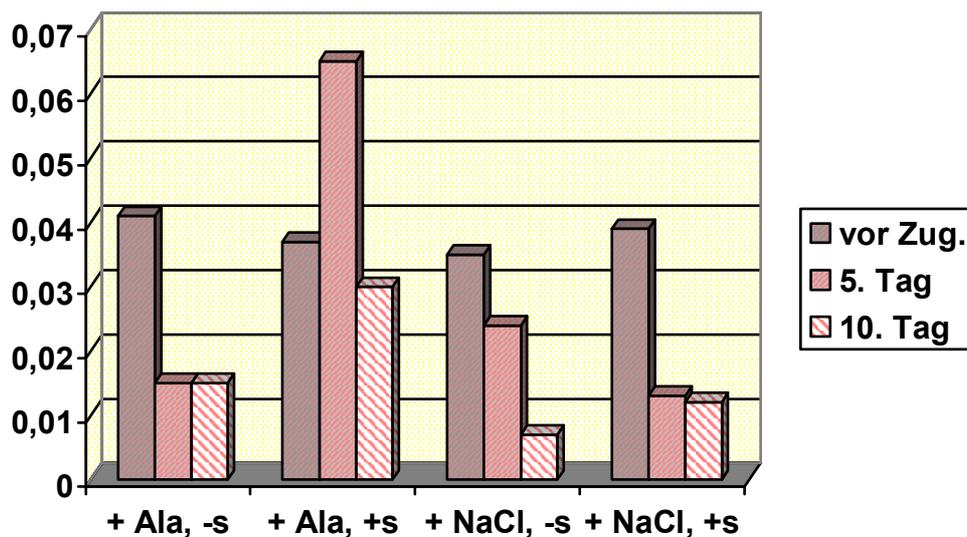


Abbildung 70 Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$ ohne IC

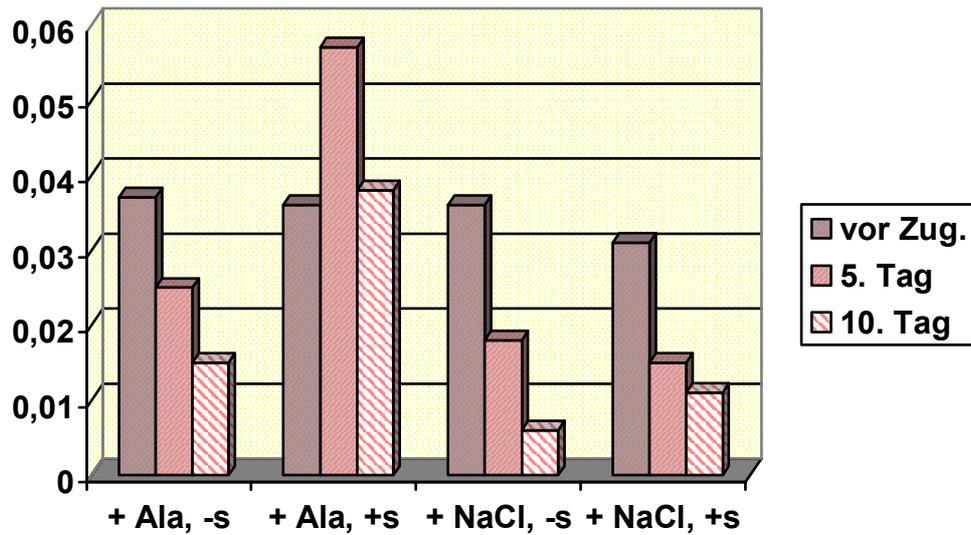


Abbildung 71 Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit IC

Ergebnisse

Durch Poly-DL-Asparaginsäure lässt sich eine teilweise Resuspension des Cholesterins erreichen, die allerdings nicht beständig ist.

Sowohl in dem Ansatz mit Immunkomplexen, als auch ohne Immunkomplexe steigt der Extinktionswert nach fünf Tagen um ca. die Hälfte des Ausgangswertes, wenn die zugegebene Testsubstanz mit dem Präzipitat durch schütteln vermischt wird und dadurch bessere Reaktionsbedingungen hat. Die Cholesterinkonzentration im Überstand sinkt aber nach zehn Tagen wieder ab, bleibt jedoch höher als die entsprechenden Werte bei den Versuchen mit NaCl.

Wird die Lösung nicht vermischt, so zeigt sich keine wesentliche Änderung des Versuchsvlaufes.

3.9.4 Versuch 25: Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000}

Die Versuchsergebnisse zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} sind in den Tabellen 76 und 77 wiedergegeben.

Die Ergebnisse sind außerdem graphisch in den Abbildungen 72 und 73 dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,030 | 0,028 | 0,028 | 0,027 |
| 5. Tag | 0,016 | 0,021 | 0,007 | 0,006 |
| 10. Tag | 0,006 | 0,005 | 0,010 | 0,008 |

Tab. 76 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,035 | 0,023 | 0,027 | 0,024 |
| 5. Tag | 0,022 | 0,012 | 0,007 | 0,008 |
| 10. Tag | 0,010 | 0,007 | 0,008 | 0,009 |

Tab. 77 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} mit Immunkomplexen

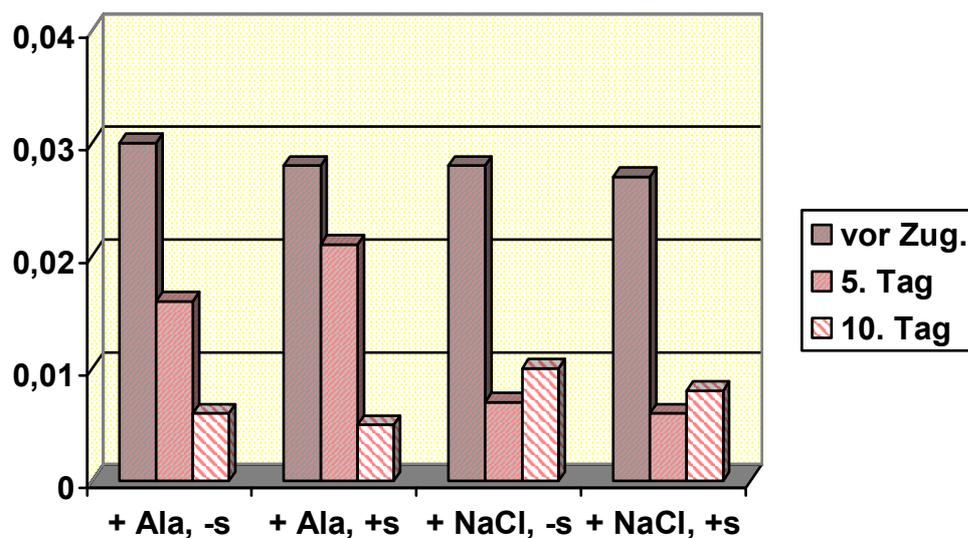


Abbildung 72 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin_{5 000 - 15 000} ohne IC

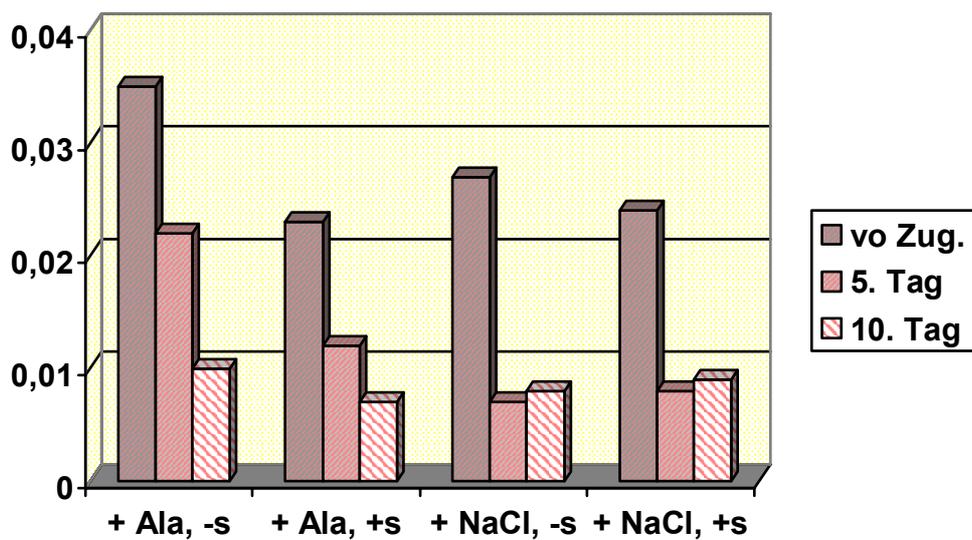


Abbildung 73 Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin₅₀₀₀₋₁₅₀₀₀ mit IC

Ergebnisse

Durch Poly-L-Ornithin ist der Reaktionsablauf praktisch nicht zu beeinflussen.

Lediglich bei den Versuchen ohne Vorhandensein von Immunkomplexen ist eine leichte Reaktionsverzögerung erkennbar.

3.9.5 Versuch 26: Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$

Die Tabellen 78 und 79 zeigen die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$.

In den Abbildungen 74 und 75 sind die Ergebnisse außerdem graphisch dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,022 | 0,026 | 0,031 | 0,028 |
| 5. Tag | 0,027 | 0,031 | 0,006 | 0,010 |
| 10. Tag | 0,058 | 0,026 | 0,005 | 0,007 |

Tab. 78 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$ ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,024 | 0,020 | 0,029 | 0,027 |
| 5. Tag | 0,028 | 0,028 | 0,007 | 0,009 |
| 10. Tag | 0,041 | 0,035 | 0,008 | 0,011 |

Tab. 79 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$ mit Immunkomplexen

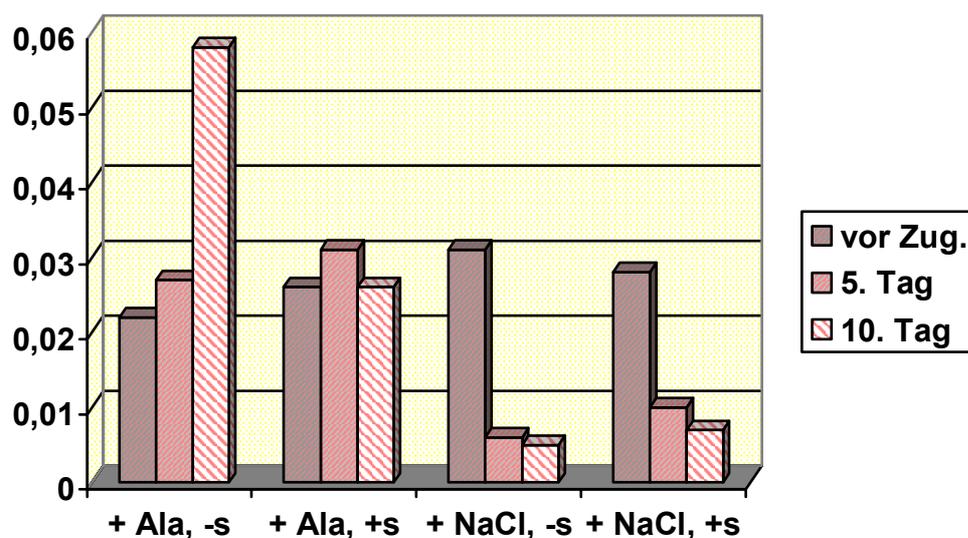


Abbildung 74 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$ ohne IC

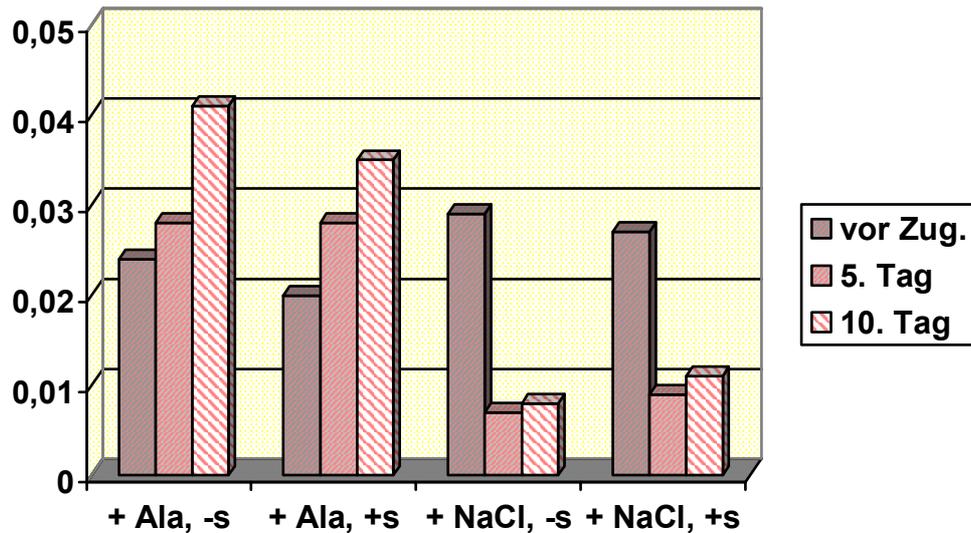


Abbildung 75 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure 2 000 - 15 000 mit IC

Ergebnisse

Mit Poly-L-Glutaminsäure mit dem Molekulargewicht von 2 000 – 15 000 Da gelingt eine bleibende Resuspension des zuvor präzipitierten Cholesterins.

Bei den Versuchen ohne Anwesenheit von Immunkomplexen ist eine sehr deutliche Extinktionswerterhöhung zu erkennen, wenn die Substanz ohne Schütteln zum Grundansatz gegeben wird. Bis zum zehnten Tag des Versuches steigt der Wert auf beinahe das dreifache des Ausgangswertes an. Wird die Probenlösung aber nach Zugabe der Substanz durchmischt, so wird der Versuchsverlauf gegenüber der Zugabe von NaCl lediglich gestoppt.

Sind Immunkomplexe im Grundansatz vorhanden, so ist es unerheblich, ob die Lösung nach der Substanzzugabe durchmischt wird oder nicht. Die Extinktionswerte und damit die Cholesterin-Konzentration im Überstand steigen gleichmäßig bis zum etwa Eineinhalbfachen des Ausgangswertes.

Das vorhandene Cholesterin konnte allerdings auch hier nicht vollständig resuspendiert werden.

3.9.6 Versuch 27: Poly-L-Glutaminsäure ₇₅₀₋₁₅₀₀

In den Tabellen 80 und 81 finden sich die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-L-Glutaminsäure ₇₅₀₋₁₅₀₀.

Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 76 und 77 graphisch dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,011 | 0,013 | 0,013 | 0,015 |
| 5. Tag | 0,019 | 0,030 | 0,013 | 0,012 |
| 10. Tag | 0,023 | 0,031 | 0,005 | 0,010 |

Tab. 80 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure ₇₅₀₋₁₅₀₀ ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,011 | 0,019 | 0,019 | 0,021 |
| 5. Tag | 0,006 | 0,028 | 0,008 | 0,008 |
| 10. Tag | 0,005 | 0,031 | 0,010 | 0,008 |

Tab. 81 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure ₇₅₀₋₁₅₀₀ mit Immunkomplexen

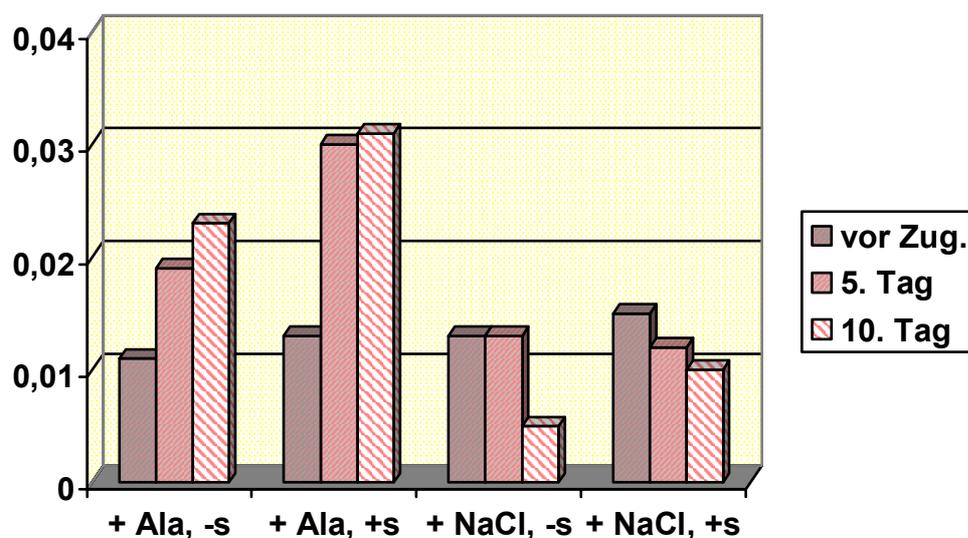


Abbildung 76 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure ₇₅₀₋₁₅₀₀ ohne IC

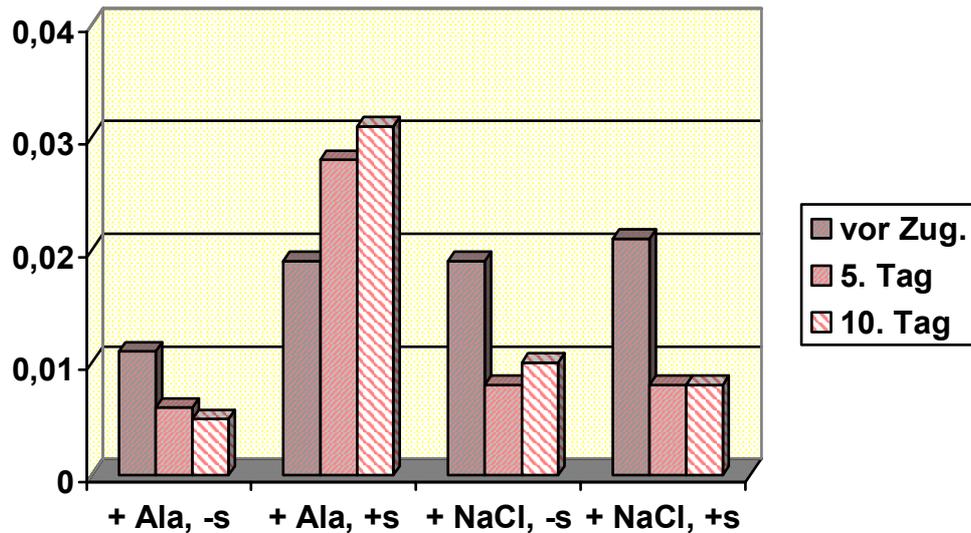


Abbildung 77 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{750 - 1500} mit IC

Ergebnisse

Auch mit dem Molekulargewicht von 750 – 1 500 Da ist durch die Substanz Poly-L-Glutaminsäure eine bleibende Erhöhung der Cholesterin-Konzentration im Überstand zu erzielen.

Dabei lässt die Durchmischung der Lösung nach Beigabe der Testsubstanz den Anstieg höher ausfallen.

Ohne Vorhandensein von Immunkomplexen ist eine kontinuierliche Zunahme der Extinktionswerte zu beobachten, wobei bis zum Versuchsende in etwa das Doppelte der Ausgangswerte erreicht wird.

Sind im Grundansatz Immunkomplexe eingebracht, so kann das suspendierte Cholesterin durch alleinige Beigabe von Poly-L-Glutaminsäure _{750 - 1500} nicht wieder in Lösung gebracht werden. Dies gelingt aber, wenn die Lösung nach Zugabe durchmischt wird. Dann ist wie in den Versuchen ohne Immunkomplexe eine bleibende Resuspension zu erreichen.

3.9.7 Versuch 28: Poly (Glu, Ala) 6:4

Die Tabellen 82 und 83 zeigen die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly (Glu, Ala) 6:4.

In den Abbildungen 78 und 79 sind diese Ergebnisse zudem graphisch dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,018 | 0,016 | 0,023 | 0,023 |
| 5. Tag | 0,009 | 0,032 | 0,010 | 0,014 |
| 10. Tag | 0,021 | 0,035 | 0,012 | 0,011 |

Tab. 82 Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,019 | 0,020 | 0,017 | 0,018 |
| 5. Tag | 0,007 | 0,036 | 0,007 | 0,010 |
| 10. Tag | 0,013 | 0,032 | 0,007 | 0,010 |

Tab. 83 Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 mit Immunkomplexen

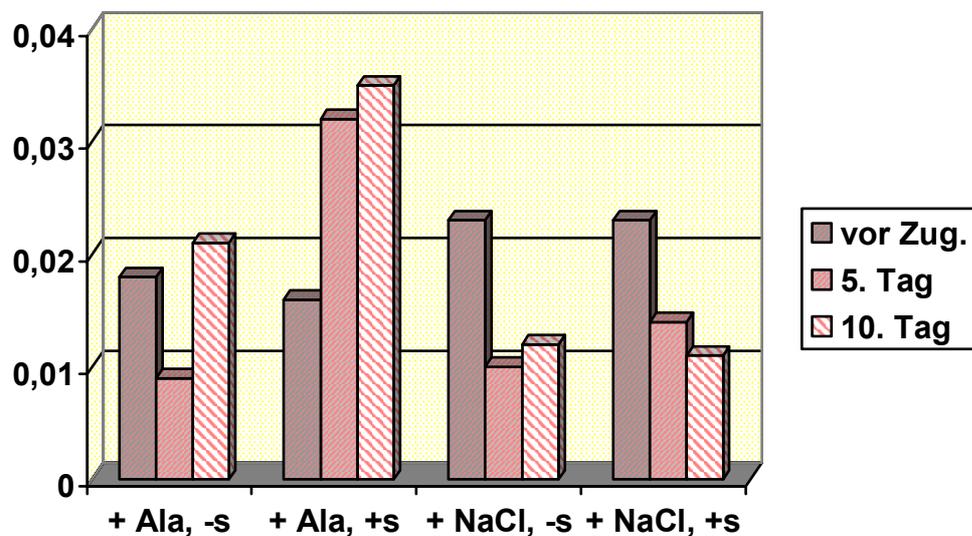


Abbildung 78 Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 ohne IC

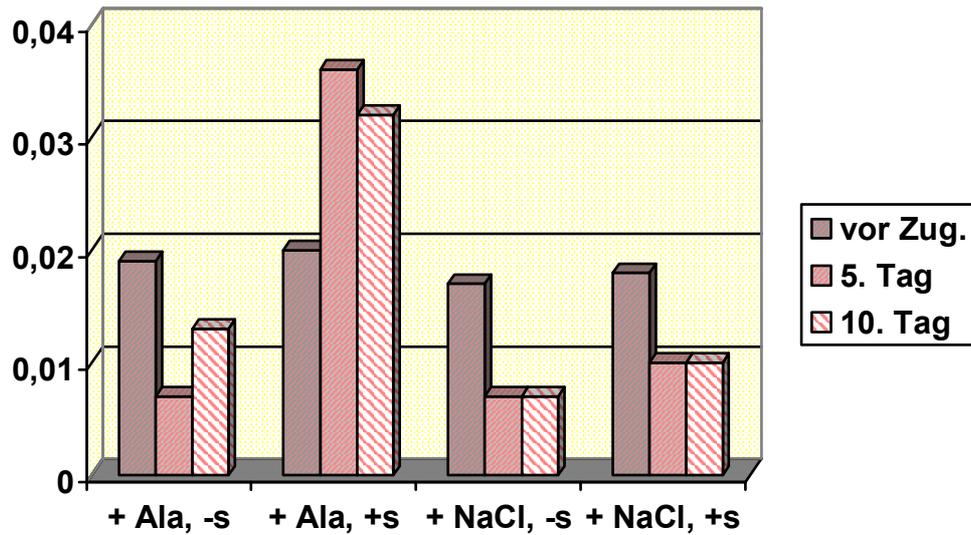


Abbildung 79 Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 mit IC

Ergebnisse

Auch die Zugabe von Poly (Glu, Ala) 6:4 führt zu einer bleibenden Resuspension des gebundenen Cholesterins.

Wird die Lösung nach Zugabe der Substanz gemischt, so ist bereits am fünften Tag des Versuches eine deutliche Steigerung der Extinktionswerte gegeben, die auch am zehnten Tag im Wesentlichen konstant bleibt.

Ohne Schütteln des Reaktionsgefäßes verläuft die Reaktion zuerst ungebremst, um schließlich aber doch eine Umkehrung zu erreichen. Nach fünf Tagen ist kein Unterschied der Extinktionswerte zwischen den Ansätzen, denen die Testsubstanz bzw. NaCl beigemischt wurde, zu erkennen. Am zehnten Tag sind die Werte bei Vorhandensein der Testsubstanz aber wiederum deutlich angestiegen, während die Werte bei NaCl zurückgingen.

3.9.8 Versuch 29: Poly-L-Tyrosin

Die Tabellen 84 und 85 zeigen die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-L-Tyrosin.

Die Ergebnisse sind außerdem graphisch in den Abbildungen 80 und 81 dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,018 | 0,011 | 0,023 | 0,023 |
| 5. Tag | 0,006 | 0,011 | 0,008 | 0,011 |
| 10. Tag | 0,009 | 0,011 | 0,007 | 0,011 |

Tab. 84 Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,018 | 0,014 | 0,017 | 0,020 |
| 5. Tag | 0,007 | 0,008 | 0,009 | 0,013 |
| 10. Tag | 0,024 | 0,010 | 0,012 | 0,013 |

Tab. 85 Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin mit Immunkomplexen

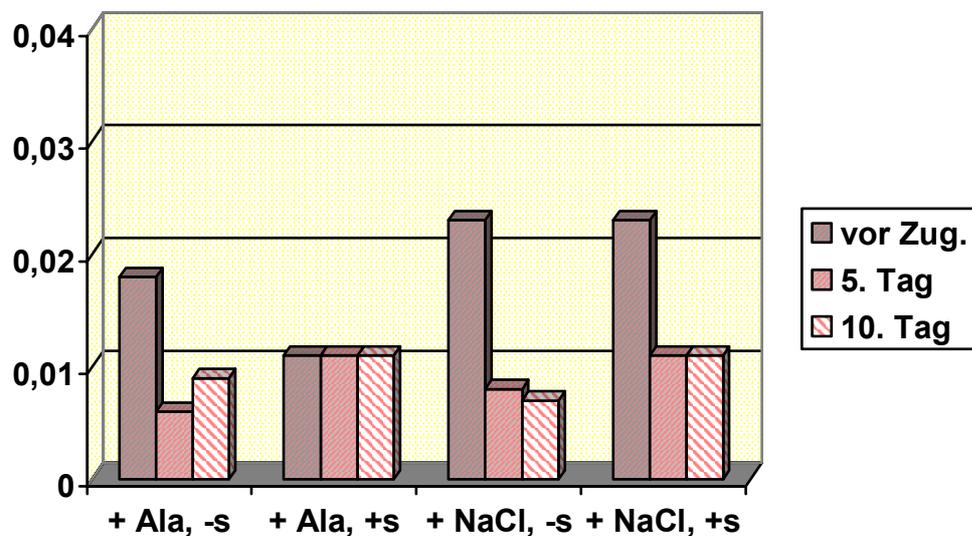


Abbildung 80 Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin ohne IC

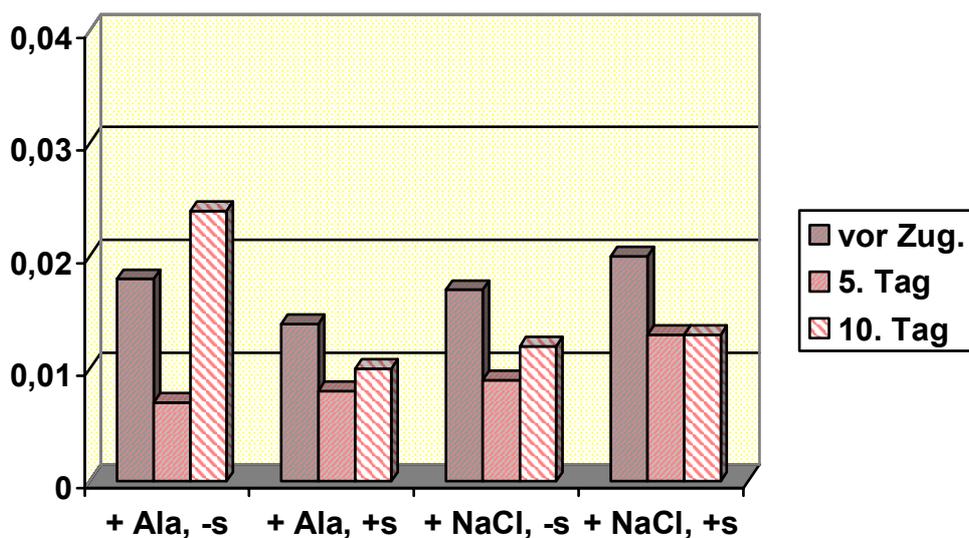


Abbildung 81 Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin mit IC

Ergebnisse

Die Substanz Poly-L-Tyrosin zeigt eine erst späte Beeinflussung des Reaktionsablaufes.

Sind im Grundansatz Immunkomplexe vorhanden, so verläuft die Reaktion bis zum fünften Tag unverändert. Am zehnten Tag ist jedoch eine Erhöhung des Extinktionswertes vorhanden, der den Ausgangswert übertrifft.

Fehlen die Immunkomplexe, ist die Reaktion mit Testsubstanz die gleiche wie wenn NaCl zugegeben wird, sofern keine Mischung der Suspension erfolgt. Durch Schütteln des Proberröhrchens konnte hier die weitere Präzipitation gestoppt werden.

3.9.9 Versuch 30: Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$

Die Ergebnisse für die Versuche zur Resuspension der Cholesterin-Partikel mit der Substanz Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ finden sich in den Tabellen 86 und 87.

Die Ergebnisse sind außerdem graphisch in den Abbildungen 82 und 83 dargestellt.

| Versuche ohne Immunkomplexe | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,020 | 0,022 | 0,021 | 0,018 |
| 5. Tag | 0,013 | 0,026 | 0,013 | 0,011 |
| 10. Tag | 0,013 | 0,024 | 0,007 | 0,008 |

Tab. 86 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ ohne Immunkomplexe

| Versuche mit Immunkomplexen | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|
| | mit Testsubstanz | | ohne Testsubstanz | |
| | ohne mischen | mit mischen | ohne mischen | mit mischen |
| vor Zug. | 0,019 | 0,019 | 0,019 | 0,020 |
| 5. Tag | 0,006 | 0,022 | 0,011 | 0,014 |
| 10. Tag | 0,007 | 0,013 | 0,004 | 0,009 |

Tab. 87 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ mit Immunkomplexen

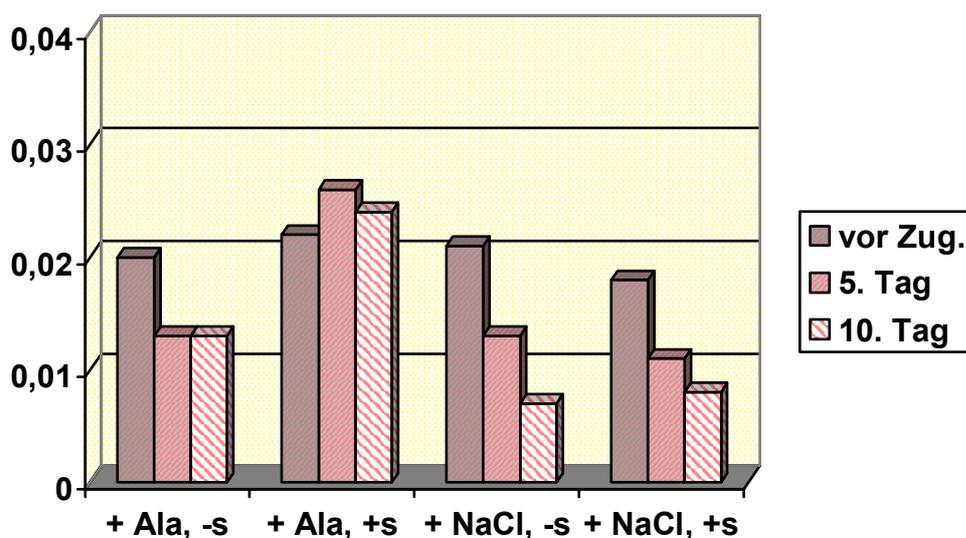


Abbildung 82 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ ohne IC

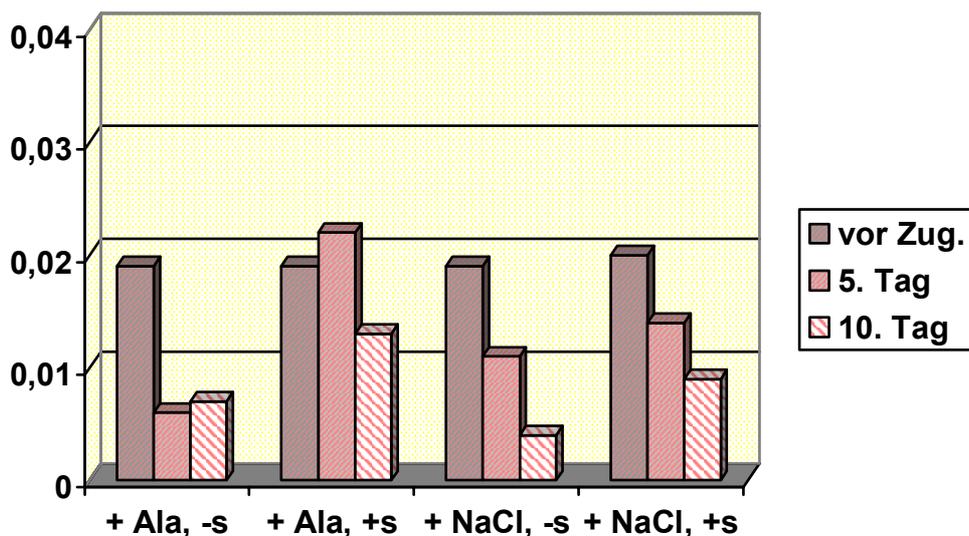


Abbildung 83 Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ mit IC

Ergebnisse

Poly-L-Glutaminsäure mit dem Molekulargewicht von $3\ 000 - 15\ 000$ Da vermag das gebundene Cholesterin nicht wieder in Lösung zu bringen, verhindert aber die weitere Präzipitation.

Bei den Versuchen mit Immunkomplexen im Ansatz bleiben die Extinktionswerte nach Zugabe der Testsubstanz gleich bzw. steigen gering an, sofern das Reaktionsgefäß geschüttelt wird. Ohne Durchmischung der vorhandenen Substanzen ist durch Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ nur eine leichte Reaktionsverzögerung zu erzielen.

Sind im Grundansatz Immunkomplexe vorhanden, zeigt sich ein ähnliches Bild. Bei Durchmischung lässt sich nach fünf Tagen eine leichte Erhöhung der Extinktionswerte verzeichnen, die bis zum zehnten Tag aber wieder auf einen Wert unter den des ersten Tages gefallen ist. Ohne Schütteln des Gefäßes verläuft die Präzipitation hier ungebremst.

4 Diskussion

Nach dem Verständnis unserer Arbeitsgruppe liegen mehreren Krankheiten, zu denen auch die Atherosklerose zählt, Pathomechanismen zugrunde, die zu einer protrahierten oder chronisch-progressiven Immunsuppression führen und in deren Zentrum Immunkomplexe und hyperaktivierte, von überstimulierten T4-Zellen unterstützte Makrophagen stehen.

Die Hyperaktivierung von Makrophagen kann durch sehr unterschiedliche Signale ausgelöst werden: Immunkomplexe, Zytokine, chronisch persistierende bakterielle oder virale Infekte. Außer „freien“ Immunkomplexen führen wohl auch Immunkomplex-Lipoprotein-Komplexe zur Dauerirritierung von Makrophagen. Diese üben bei ständiger Stimulation eine stark immunsuppressive Wirkung auf kooperierende Immunozyten aus.

Veränderte Lipoprotein-Vesikel werden über Scavenger-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren oder receptorunabhängig durch ladungsbedingte Endozytose aufgenommen. Die Fc-Rezeptor-vermittelte LDL-Aufnahme ist dabei nur in Form von LDL-IC-Komplexen möglich. Ob das LDL über den Scavenger-Rezeptor oder über Endozytose aufgenommen wird, dürfte vor allem vom pH-Wert des Mikromilieus abhängen. Die ladungsabhängige Endozytose kommt nur bei niedrigem pH in Frage, da der LDL-IC-Komplex nur bei positiver Ladung auf diesem Weg aufgenommen werden kann. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn der pH unterhalb des isoelektrischen Punktes des IC liegt.

Cholesterinhaltige Lipoproteine werden nach unseren Erkenntnissen durch Immunglobuline stabilisiert. Diese Stabilisierung zeigt gewisse Parallelen zur Stabilisierung von hydrophilen Kolloiden durch den sogenannten „diffusen“ Wassermantel. Diese äußere Hülle mit partiell geordneten Wasser-Dipolen stellt eine zusätzliche Stabilisierung des inneren, streng geordneten sogenannten „konkreten“ Wassermantels dar. Während die hydrophoben Kolloide ihre Stabilität ausschließlich der elektrischen Ladung, d.h. den direkten Coulombschen Repulsionskräften zwischen gleichsinnig geladenen Kolloidpartikeln verdanken, profitieren die hydrophilen Kolloide von einem weiteren Stabilitätsfaktor, dem Hydratationsphänomen.

Die Ig-vermittelte Schutzfunktion ist nur bei intakten monomeren Immunglobulinen gewährleistet. Ändern sich die physikochemischen Eigenschaften durch Bindung des spezifischen Antigens, also durch IC-Bildung oder durch Schädigung der Immunglobuline (Denaturierung

und/oder partielle Aggregation), geht der Schutzeffekt verloren. Bei IC-bedingter Konformationsänderung bzw. bei Aggregation des Ig-Moleküls z.B. im Mikromilieu des hyperaktivierten Makrophagen wandelt sich der Schutzeffekt sogar in eine Destabilisierung des Lipoproteinvesikels und des darin enthaltenen Cholesterols um.

Zum einen wirken Immunkomplexe also durch ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften auf Plasma-Lipoproteine bzw. auf das enthaltene Cholesterol destabilisierend, zum anderen unterstützen sie die Aufnahme von Cholesterol durch den Makrophagen. IC-LDL-Komplexe fördern die Aufnahme von Cholesterol über den Fc-Rezeptor und beschleunigen damit die Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen.

Bei einem pH von 7,4 reicht die Destabilisierung von LDL-IC-Komplexen nicht aus, um Cholesterol zu präzipitieren. Wie Untersuchungen mit synthetischen Polypeptiden zeigten, müssen bei diesem physiologischen pH-Wert basische Promotorproteine hinzukommen, um das Plasma-Cholesterol zu destabilisieren. Bei Bedingungen des lokalen pH-Abfalles, wie er im Mikromilieu von aktivierten Makrophagen oder in hypoxischem Entzündungsgewebe persistieren kann, übernehmen Immunkomplexe sowohl die Rolle des LDL-Destabilisators, als auch des kationischen Starterproteins und bewirken damit die lokale Präzipitation des Plasma-Cholesterols. Dies folgt aus dem nur wenig unter dem physiologischen pH liegenden isoelektrischen Punkt von Immunkomplexen.

In der vorliegenden Dissertation sollten vor allem die physikalisch-chemischen Wechselwirkungen von Immunkomplexen und Plasma-Lipoprotein-Partikeln mit verschiedenen Plasma-proteinen bzw. verschiedenen Sekretionsprodukten aktivierter immunkompetenter Zellen widergespiegelt werden. Die Versuche sollten einen Teil zur Aufklärung der ablaufenden Prozesse bei atheromatösen Gefäßveränderungen leisten.

Die Untersuchungen beziehen sich auf die z.T. sehr komplexen Wechselwirkungen einiger synthetischer Polypeptide, von Lysozym, einem Ausscheidungsprodukt hyperaktivierter Makrophagen, und von Homocystein bzw. Homocystein-Thiolacton mit cholesterolhaltigen Plasma-Lipoproteinen. Durch die Wahl der zugrundeliegenden Aminosäure bei den Homopolymeren konnten sowohl die Wirkungsunterschiede von positiv bzw. negativ geladenen Partikeln als auch von stärker oder schwächer geladenen Partikeln untersucht werden. Bei den

Heteropolymeren konnte man den Anteil der positiv und negativ geladenen Domänen einerseits und jenen der polaren und apolaren Regionen andererseits variieren.

Eine sehr wesentliche Größe für die Untersuchung war die Variation des pH-Wertes in den Einzelversuchen. Dabei wurde vor allem an die veränderten Bedingungen im Mikromilieu des hyperaktivierten Makrophagen gedacht. Ein weiterer Gegenstand der Untersuchung war die Abhängigkeit der Präzipitation von der Molekülgröße der verwendeten Polymere.

Sehr große Bedeutung in den Versuchen wurde der Zugabe von Immunkomplexen beigemessen. Immunkomplexen kommt nach unseren Überlegungen eine besondere Rolle bei der Stabilisierung bzw. Destabilisierung Cholesterol-haltiger Lipoproteine zu. Ihnen könnte, wie bereits erwähnt, in mehrerer Hinsicht die Rolle eines Vermittlers zukommen, durch dessen Anwesenheit die physikalisch-chemischen Verhältnisse so verändert werden, dass Cholesterol leichter präzipitiert. Von Interesse war bei unseren Untersuchungen, ob die Reihenfolge der Zugabe von Immunkomplexen und der Testsubstanz Einfluss auf die ablaufende Reaktion hatte. Es sollte also untersucht werden, ob eine Vorinkubation der LDL-Partikel mit Immunkomplexen die Oberflächestrukturen der Lipoproteine so verändert, dass eine Präzipitation des Cholesterols entweder vermindert oder beschleunigt würde. Dazu wurden einmal in den fertigen Versuchsansatz zuerst die Immunkomplexe und nach 15 Minuten Inkubationszeit die Testsubstanz zugegeben, das andere Mal die jeweilige Testsubstanz fünfzehn Minuten vor den Immunkomplexen.

Homocystein und sein Metabolit Homocystein-Thiolacton scheinen bei der Entstehung der Atherosklerose eine aktive Rolle zu spielen. Deshalb sollte in dieser Dissertation auch untersucht werden, ob es ähnlichen Mechanismen unterliegt wie die von uns untersuchten Polypeptide. Dazu wurden beide Stoffe, wie alle anderen Testsubstanzen auch, unter den Bedingungen verschiedener pH-Werte und in Interaktion mit und ohne Immunkomplexe untersucht. Eine weitere Frage war, ob die Chiralität des Moleküls Unterschiede im Präzipitations-Verhalten der LDL-Partikel hervorbringt.

Der zweite Teil dieser Dissertation widmete sich der Frage, ob einmal präzipitiertes Cholesterin durch die Zugabe verschieden geladener Polypeptide wieder in Lösung gebracht werden kann. Dazu wurde ein bekannter Versuchsansatz ausgewählt, bei dem Präzipitation in hohem Maße stattfand, und dem die zu untersuchenden Substanzen beigegeben wurden.

Im Folgenden seien die wesentlichen Trends unserer Untersuchungen dargestellt:

Weder saure Mucopolysaccharide (AMPS) noch Immunkomplexe sind bei neutralem pH in der Lage, eine Destabilisierung des Plasmas auszulösen. Dies kann aber von denjenigen Sekretionsprodukten geleistet werden, deren isoelektrischer Punkt oberhalb pH 7,4 liegt. Auch Modellpolypeptide wie Poly-L-Arginin sowie entsprechende Copolymere mit hydrophoben Aminosäuren sind in der Lage, ohne Vermittlermoleküle wie Immunkomplexe das Plasma-Cholesterin zu destabilisieren.

Die Versuche 1 – 6 mit der stark basischen Aminosäure Arginin zeigen eine deutliche Abhängigkeit von dem im Ansatz herrschenden pH-Wert. Bei niedrigem pH führte keiner der von uns gewählten Versuchsansätze zur Präzipitation des Cholesterins. Bei pH 7 und pH 5 ist eine kontinuierliche Extinktionsabnahme zu verzeichnen, die durch verschiedene Einflussgrößen verstärkt oder verzögert werden kann. Mit steigender Molekülmasse wird die Präzipitation bei pH 7 beschleunigt, wohingegen bei pH 5 Immunkomplexe als Promotorproteine notwendig sind. Das Heteropolymer mit Tryptophan zeigt eine Verschiebung der stärksten Reaktion in den sauren Bereich um pH 5, wo im Überstand der Lösung bereits nach einem Tag kein Cholesterin mehr nachzuweisen ist.

Stark saure Polypeptide wie Poly-L-Aspartat destabilisieren das Plasma-Cholesterin nur bei reduziertem pH-Wert und nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Immunkomplexen. In den Versuchen 7 – 9 ist bei pH 5 ein leichter Abfall bis zum 10. Tag zu verzeichnen, wenn Immunkomplexe als Promotorproteine anwesend sind. Als stark anionische Moleküle, die bei lokal erniedrigtem pH Cholesterin reduzieren könnten, kommen in vivo verschiedene Vertreter der sauren Mucopolysaccharide (AMPS, GAG), z.B. Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure, Heparin und Heparansulfat in Frage. Alternativ oder unterstützend könnten stark saure (Glyko-)Proteine, z.B. einige Vertreter der APP (akute Phase-Proteine) „einspringen“. Sie sind jedoch weniger effizient als die AMPS.

Homocystein, ein unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose, war zusammen mit seinem Thioester Homocystein-Thiolacton Gegenstand der Untersuchung der Versuche 10 – 13. Die Ergebnisse zeigten insgesamt geringere Veränderungen als diejenigen, die mit synthetischen Polypeptiden erzielt wurden. Jedoch sind einige interessante Aspekte zu Tage getreten:

Durch DL-Homocystein war die Cholesterin-Konzentration im Überstand bereits am ersten Messtag bis auf 20 % des eigentlichen Wertes zurückgegangen. Bei den Ansätzen mit saurem Milieu, bei pH 5 und pH 3, änderte sich dieser Wert bis zum letzten Tag der Messung nur mehr gering. Bei pH 7 wurde dagegen das zuvor präzipitierte Cholesterin kontinuierlich wieder in Lösung gebracht und erreichte am zehnten Tag den Wert, der sonst als Ausgangswert der Messung anzutreffen ist. Man kann also annehmen, dass das zunächst präzipitierte Cholesterin wieder vollständig in die gelöste Form übergegangen ist. Die Anwesenheit von Immunkomplexen beeinflusst den Versuchsablauf hier nicht.

Bei dem lediglich in seiner Chiralität unterschiedlichen L-Homocystein war diese Auffälligkeit nicht zu erkennen. Hier zeigte sich eine leichte Extinktionsabnahme, die mit sinkendem pH-Wert zunahm. Die Anwesenheit von Immunkomplexen stellte sich hier als Präzipitationshemmnis heraus, und zwar unabhängig vom Zeitpunkt ihrer Zugabe.

Von Homocystein-Thiolacton ist bereits bekannt, dass es mit LDL-Partikeln Aggregate bildet (58). Auch hier wurden zwei Versuche mit unterschiedlicher Chiralität der Testsubstanz durchgeführt. Mit L-Homocystein-Thiolacton fielen die Änderungen hierbei geringer aus als mit D-Homocystein-Thiolacton, hatten aber die gleiche Qualität. Die Cholesterin-Konzentration im Ansatzüberstand verringerte sich durch D-Homocystein-Thiolacton in kontinuierlicher Art und Weise auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes. Bei saurem pH war die Abnahme weniger deutlich. Immunkomplexe scheinen die LDL-Partikel gegenüber Homocystein-Thiolacton zu stabilisieren. Wurden sie vor der Testsubstanz zu der Lösung gegeben, verminderten sie die spätere Präzipitation des Cholesterins.

Versuch 14, 15 und 16 mit Poly-L-Ornithin als Testsubstanz zeigen die Abhängigkeit der Plasmadestabilisierung von der Molekülgröße. Je größer das Molekül, desto deutlicher fällt die Präzipitation des Cholesterols aus. Im stark sauren Bereich bei pH 3 kommt jedoch bei allen drei Versuchen keine Präzipitation zustande. Immunkomplexe bewirken eine Beschleunigung der Präzipitation.

Zusammenfassend scheint ein über dem pH des Mikromilieus liegender IP-Wert, gepaart mit dem partiell-hydrophoben Charakter (apolare Domänen) des Moleküls das wesentliche Merkmal eines plasma-destabilisierenden Promotorproteins zu sein. Als Schutzmechanismus gegen

fatale Präzipitatbildung kann angesehen werden, dass stark saure Moleküle bei physiologischem pH nicht mit Plasmaproteinen interagieren. Basische Proteine und Polypeptide wie z.B. Lysozym, einige Zytokine, normalerweise unzugängliche Bestandteile des Zellkerns (Histone) und Mitochondrien sind dagegen durch ihren hohen IP imstande, bei neutralem und saurem pH mit negativ geladenen Plasmaproteinen zu interagieren. Sie besitzen daher unabhängig vom pH die Fähigkeit, als Promotormolekül die Destabilisierung des Plasmas anzustoßen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte versucht werden, eine bereits stattgefundenene Präzipitation wieder rückgängig zu machen, das heißt, das gebundene Cholesterol sollte wieder in Lösung gebracht werden. Dazu wurde ein Versuchsaufbau ausgewählt, bei dem es rasch zu einer Verminderung der Extinktionswerte kam. Dieses System wurde mit dem Ansatz der Substanz Poly (Arg, Trp) 4:1 bei einem pH-Wert von fünf gefunden, welches in Versuch fünf untersucht wurde. Hier kam es bereits nach einem Tag zu einer starken Abnahme der Extinktionswerte, was auf eine starke Präzipitation hinweist.

Innerhalb der Resuspensionsversuche wurden nun, einen Tag nachdem der Versuchsaufbau zubereitet wurde, verschiedene Substanzen zu dem System gegeben und nach fünf und zehn Tagen wiederum die Extinktion einer Probe aus dem Überstand gemessen. Zur Kontrolle wurde einem gleichen System statt der gelösten Testsubstanz in gleicher Menge 0,9%ige NaCl-Lösung beigegeben.

Auch hier wurde untersucht, ob den Immunkomplexen eine besondere Vermittlerrolle zukommt. Dazu wurden die Versuche einmal mit und einmal ohne Immunkomplexe durchgeführt. Eine weitere Frage, die beantwortet werden sollte, war, ob eine Durchmischung des Probenansatzes nach Zugabe der Testsubstanz die Resuspension unterstützen konnte. Hierfür wurde die Testsubstanz einmal nur langsam der Lösung beigegeben, um ein Aufwirbeln des Präzipitates zu vermeiden, das andere Mal wurde die Lösung nach Zugabe kräftig geschüttelt.

Die Ergebnisse dieser Versuche seien im Folgenden kurz skizziert:

Versuch 22 und 23 mit Poly-Alanin bzw. Poly-Glycin zeigten keine Unterschiede im Vergleich der Ansätze, denen die jeweilige Testsubstanz beigegeben wurde gegenüber der NaCl-Beigabe. Mit diesen Substanzen konnte kein präzipitiertes Cholesterol wieder in Lösung gebracht werden.

Durch Poly-DL-Asparaginsäure, die im ersten Teil dieser Arbeit ebenfalls untersucht wurde und keine Präzipitation bewirkte, lässt sich eine teilweise Resuspension des Cholesterins erreichen, die allerdings nicht beständig ist. Sowohl in dem Ansatz mit Immunkomplexen, als auch ohne Immunkomplexe steigt der Extinktionswert nach fünf Tagen um ca. die Hälfte des Ausgangswertes, wenn die zugegebene Testsubstanz mit dem Präzipitat durch schütteln vermischt wird und dadurch bessere Reaktionsbedingungen hat. Die Cholesterinkonzentration im Überstand sinkt aber nach zehn Tagen wieder ab, es ist also keine bleibende Resuspension zu verzeichnen.

Mit Poly-L-Glutaminsäure gelang jedoch eine bleibende Resuspension des zuvor präzipitierten Cholesterins. Bei den Versuchen ohne Anwesenheit von Immunkomplexen ist eine sehr deutliche Extinktionswerterhöhung zu erkennen. Bis zum zehnten Tag des Versuches steigt der Wert auf beinahe das dreifache des Ausgangswertes an. Das vorhandene Cholesterin konnte allerdings auch hier nicht vollständig resuspendiert werden. Bei Vorhandensein von Immunkomplexen war der Anstieg geringer, was darauf hindeutet, dass die einmal präzipitierten Aggregate durch Immunkomplexe stabilisiert werden.

Auch die Zugabe von Poly (Glu, Ala) 6:4 führt zu einer bleibenden Resuspension des Cholesterins.

5 Zusammenfassung

Cholesterol-transportierende Lipoprotein-Vesikel (LDL, VLDL) scheinen im Plasma zum Teil mit Immunglobulinen assoziiert zu sein. Durch Antigenbindung und Einbindung von Lipoproteinen in Immunkomplexe kommt es vermutlich zu Konformationsänderungen der Oberflächenproteine, die zu einer Denaturierung bzw. Aggregation der Lipoprotein-Vesikel führen.

Die Destabilisierung des LDL-IC-Komplexes reicht unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) allerdings nicht aus, um eine Cholesterol-Präzipitation zu indizieren. Hier ist zumindest eine kleine Menge eines basischen Promotorproteins notwendig, um die Destabilisierung einzuleiten. Im Mikromilieu hyperaktivierter Makrophagen oder in hypoxischem Entzündungsgewebe könnten durch lokalen pH-Abfall aber Bedingungen entstehen, bei denen Immunkomplexe sowohl die Rolle des LDL/VLDL-Destabilisators als auch des Promotorproteins übernehmen könnten.

Die Zielsetzung dieser Dissertation bestand darin, die Rolle von Immunkomplexen bei der Destabilisierung von Plasma-Lipoproteinen genauer zu untersuchen und dadurch Aussagen über immunologische Aspekte der Atherogenese machen zu können. Außerdem wurde in einem zweiten Teil untersucht, ob eine einmal stattgefundenen Präzipitation wieder rückgängig gemacht werden kann und Cholesterol so wieder in Lösung gebracht wird. Diese Versuche sollten einen Beitrag zur Beantwortung der Frage leisten, ob es möglich ist, durch Rückführung des Mikromilieus in einen antiatherogenen Zustand präzipitierte Lipide aus der Arterienwand zu mobilisieren.

Zu diesem Zweck wurden in normalem Humanserum enthaltene Lipoproteine mit verschiedenen Polypeptiden inkubiert und anhand einer Messung von Cholesterol im Überstand geprüft, ob eine Ausfällungsreaktion stattgefunden hat. Jeder Einzelversuch wurde bei den pH-Werten sieben, fünf und drei und hier wiederum sowohl mit als auch ohne Anwesenheit von Immunkomplexen durchgeführt, um den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Aggregation beurteilen zu können. Ein weiterer Gegenstand der Untersuchung war die Abhängigkeit der Präzipitation von der Molekülgröße der verwendeten Polypeptide.

In unseren Versuchen zeigte sich, dass basische Modellpolypeptide wie Poly-L-Arginin und entsprechende Copolymere imstande sind, bei neutralem pH-Wert und ohne Vermittlermolekül Lipoproteine zu destabilisieren. Stark saure Polypeptide wie Poly-L-Asparaginsäure führen nur bei vermindertem pH-Wert zur Präzipitation. Bei geringer Molekülgröße ist hier nur in Anwesenheit von Immunkomplexen eine Cholesterol-Verarmung im Überstand nachweisbar. Immunkomplexe beschleunigen die Destabilisierung des Plasma-Cholesterols im allgemeinen, unter manchen Bedingungen sind sie sogar erforderlich, um eine Präzipitation zu ermöglichen. Auch Homocystein bzw. Homocystein-Thiolacton scheinen eine Präzipitation von Lipoproteinen begünstigen zu können. Detailliertere Untersuchungen könnten hier einen Beitrag zur weiteren Aufklärung des Pathomechanismus des Homocysteins bei der Atherosklerose leisten.

Für den zweiten Teil dieser Dissertation wurde ein stark präzipitierendes System ausgewählt, dem nach entsprechender Reaktionszeit verschiedene Polypeptide zugegeben wurden und wiederum in verschiedenen Abständen der Cholesterol-Gehalt im Überstand gemessen wurde. Auch diese Versuche wurden mit und ohne Immunkomplexe durchgeführt.

Mit einigen Substanzen konnte eine Resuspension des Cholesterols erzielt werden, wobei diese zum Teil nur vorübergehend waren. Ein Einfluss von unspezifischen Immunkomplexen auf den Reaktionsverlauf war bei unseren Versuchen zur Resuspension nicht festzustellen. Auch hier sind weitergehende Untersuchungen erforderlich, um genauere Aussagen machen zu können.

Endgültige Aussagen zur Pathogenität von LDL-IC-Komplexen sollten tierexperimentellen und klinischen Studien vorbehalten bleiben.

6 Literaturverzeichnis

1. Abraham R, Choudhury A, Basu SK, Bal V, Rath S.
Disruption of T cell tolerance by directing a self antigen to macrophage-specific scavenger receptors.
J Immunol. 1997 May 1;158(9):4029-35.
2. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF.
Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.
Nature. 1998 Aug 27;394(6696):894-7.
3. Brattstrom L, Israelsson B, Lindgarde F, Hultberg B.
Higher total plasma homocysteine in vitamin B12 deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency.
Metabolism. 1988 Feb;37(2):175-8.
4. Brown MS, Goldstein JL.
Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.
Annu Rev Biochem. 1983;52:223-61.
5. Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon G.
Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC.
Free Radic Biol Med. 1991;11(3):247-53.
6. Chauveau P, Chadeaux B, Coude M, Aupetit J, Hannedouche T, Kamoun P, Jungers P.
Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients.
Kidney Int Suppl. 1993 Jun;41:S72-7.
7. Dinarello CA.
Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.
Blood. 1991 Apr 15;77(8):1627-52.
8. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H.
Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.
Free Radic Biol Med. 1991;11(1):81-128.
9. Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ.
Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine.
J Biol Chem. 1988 Aug 25;263(24):11750-4.
10. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK.
Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines.
Atherosclerosis. 1999 Jul;145(1):33-43

11. Gerrity RG.
The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions.
Am J Pathol. 1981 May;103(2):181-90.
12. Gonen B, Baenziger J, Schonfeld G, Jacobson D, Farrar P.
Nonenzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro. Effects on cell-interactive properties.
Diabetes. 1981 Oct;30(10):875-8.
13. Griffith RL, Virella GT, Stevenson HC, Lopes-Virella MF.
Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes. A possible mechanism of foam cell formation.
J Exp Med. 1988 Sep 1;168(3):1041-59.
14. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ.
Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.
Mol Cell. 1998 Aug;2(2):275-81.
15. Heinecke JW.
Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis.
Atherosclerosis. 1998 Nov;141(1):1-15.
16. Heitzer T, Yla-Herttuala S, Luoma J, Kurz S, Munzel T, Just H, Olschewski M, Drexler H.
Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL.
Circulation. 1996 Apr 1;93(7):1346-53.
17. Jaattela M.
Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor-alpha/cachectin.
Lab Invest. 1991 Jun;64(6):724-42.
18. Jakubowski H.
Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation.
J Biol Chem. 2000 Feb 11;275(6):3957-62.
19. Jakubowski H.
Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylation in humans.
J Nutr. 2000 Feb;130(2S Suppl):377S-381S.
20. Jakubowski H.
Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels.
FASEB J. 1999 Dec;13(15):2277-83.

21. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A.
Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: implications for atherosclerosis.
Circ Res. 2000 Jul 7;87(1):45-51.
22. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK.
Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.
Arteriosclerosis. 1986 Mar-Apr;6(2):131-8.
23. Kang SS, Wong PW, Malinow MR.
Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease.
Annu Rev Nutr. 1992;12:279-98.
24. Kang SS, Wong PW, Norusis M.
Homocysteinemia due to folate deficiency.
Metabolism. 1987 May;36(5):458-62.
25. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P.
An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium.
Arterioscler Thromb. 1993 Feb;13(2):197-204.
26. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT.
Macrophages and atherosclerotic plaque stability.
Curr Opin Lipidol. 1996 Oct;7(5):330-5.
27. Libby P, Hansson GK.
Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions.
Lab Invest. 1991 Jan;64(1):5-15.
28. Libby P, Ridker PM, Maseri A.
Inflammation and atherosclerosis.
Circulation. 2002 Mar 5;105(9):1135-43.
29. Lopes-Virella MF, Virella G.
Atherosclerosis and autoimmunity.
Clin Immunol Immunopathol. 1994 Nov;73(2):155-67.
30. Lopes-Virella MF, Klein RL, Lyons TJ, Stevenson HC, Witztum JL.
Glycosylation of low-density lipoprotein enhances cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages.
Diabetes. 1988 May;37(5):550-7.
31. Lopes-Virella MF, Virella G.
Cytokines, modified lipoproteins, and arteriosclerosis in diabetes.
Diabetes. 1996 Jul;45 Suppl 3:S40-4.
32. Lyons TJ, Jenkins AJ.
Lipoprotein glycation and its metabolic consequences.
Curr Opin Lipidol. 1997 Jun;8(3):174-80.

33. Lyons TJ, Klein RL, Baynes JW, Stevenson HC, Lopes-Virella MF.
Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low-density lipoproteins from type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: the influence of non-enzymatic glycosylation of low-density lipoproteins.
Diabetologia. 1987 Dec;30(12):916-23.
34. Maggi E, Chiesa R, Melissano G, Castellano R, Astore D, Grossi A, Finardi G, Bellomo G.
LDL oxidation in patients with severe carotid atherosclerosis. A study of in vitro and in vivo oxidation markers.
Arterioscler Thromb. 1994 Dec;14(12):1892-9.
35. Mayer EL, Jacobsen DW, Robinson K.
Homocysteine and coronary atherosclerosis.
J Am Coll Cardiol. 1996 Mar 1;27(3):517-27.
36. Mironova MA, Klein RL, Virella GT, Lopes-Virella MF.
Anti-modified LDL antibodies, LDL-containing immune complexes, and susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with type 2 diabetes.
Diabetes. 2000 Jun;49(6):1033-41.
37. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M.
Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes.
Biochem Biophys Res Commun. 1990 Dec 31;173(3):932-9.
38. Naruszewicz M, Mirkiewicz E, Olszewski AJ
Thiolation of low-density lipoprotein by homocystein thiolactone causes increased aggregation and altered interaction with cultured macrophages.
Metabolism. 1992 Nov;41(11):1215-24.
39. Orekhov AN, Kalenich OS, Tertov VV, Novikov ID.
Lipoprotein immune complexes as markers of atherosclerosis.
Int J Tissue React. 1991;13(5):233-6.
40. Palinski W, Witztum JL.
Immune responses to oxidative neoepitopes on LDL and phospholipids modulate the development of atherosclerosis.
J Intern Med. 2000 Mar;247(3):371-80.
41. Ross R.
Atherosclerosis--an inflammatory disease.
N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
42. Ross R.
The pathogenesis of atherosclerosis--an update.
N Engl J Med. 1986 Feb 20;314(8):488-500.
43. Ross R.
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

44. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyysönen K, Palinski W, Witztum JL.
Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis.
Lancet. 1992 Apr 11;339(8798):883-7.
45. Savolainen A, von Essen R, Leikola J, Alfthan G, Vaarala O, Palosuo T, Aho K.
Antibodies against oxidised low-density lipoprotein in juvenile chronic arthritis.
Scand J Rheumatol. 1995;24(4):209-11.
46. Schleicher E, Deufel T, Wieland OH.
Non-enzymatic glycosylation of human serum lipoproteins. Elevated epsilon-lysine glycosylated low density lipoprotein in diabetic patients.
FEBS Lett. 1981 Jun 29;129(1):1-4.
47. Schulze-Koops H, Kalden JR.
The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis.
Best Pract Res Clin Rheumatol. 2001 Dec;15(5):677-91.
48. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J.
Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry.
J Clin Invest. 1988 Feb;81(2):466-74.
49. Strydom HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.
A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.
Circulation. 1994 May;89(5):2462-78.
50. Steinberg D.
Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance.
J Biol Chem. 1997 Aug 22;272(34):20963-6.
51. Steinerová A, Racek J, Stozický F, Zima T, Fialová L, Lapin A.
Antibodies against oxidized LDL--theory and clinical use.
Physiol Res. 2001;50(2):131-41.
52. Tertov VV, Orekhov AN, Kacharava AG, Sobenin IA, Perova NV, Smirnov VN.
Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis.
Exp Mol Pathol. 1990 Jun;52(3):300-8.
53. Tertov VV, Orekhov AN, Sayadyan KS, Serebrennikov SG, Kacharava AG, Lyakishev AA, Smirnov VN.
Correlation between cholesterol content in circulating immune complexes and atherogenic properties of CHD patients' serum manifested in cell culture.
Atherosclerosis. 1990 Apr;81(3):183-9.

54. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH.
Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.
Clin Chem. 1993 Sep;39(9):1764-79.
55. Vaarala O.
Antibodies to oxidised LDL.
Lupus. 2000;9(3):202-5.
56. van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE.
Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis
suggesting an immune mediated response.
Lab Invest. 1989 Aug;61(2):166-70.
57. Virella G, Munoz JF, Galbraith GM, Gissinger C, Chassereau C, Lopes-Virella MF.
Activation of human monocyte-derived macrophages by immune complexes
containing low-density lipoprotein.
Clin Immunol Immunopathol. 1995 May;75(2):179-89.
58. Welch GN, Loscalzo J.
Homocysteine and atherothrombosis.
N Engl J Med. 1998 Apr 9;338(15):1042-50.
59. Wilcken DE, Gupta VJ.
Sulphur containing amino acids in chronic renal failure with particular
reference to homocystine and cysteine-homocysteine mixed disulphide.
Eur J Clin Invest. 1979 Aug;9(4):301-7.
60. Xu Q, Dietrich H, Steiner HJ, Gown AM, Schoel B, Mikuz G, Kaufmann SH, Wick G.
Induction of arteriosclerosis in normocholesterolemic rabbits by
immunization with heat shock protein 65.
Arterioscler Thromb. 1992 Jul;12(7):789-99.

7 Tabellenverzeichnis

| | Seite | |
|---------|--|----|
| Tab. 1 | Präzisionskontrolle des Monotests Cholesterin mit Preciset in Fünffachbestimmung (I, II, III, IV, V); P = Probe | 17 |
| Tab. 2 | Pipettierschema für die Referenzwertbestimmung | 23 |
| Tab. 3 | Messergebnisse für die Referenzwertbestimmung | 23 |
| Tab. 4 | Pipettierschema für die Versuche 1 - 21 | 25 |
| Tab. 5 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ ohne Zugabe von Immunkomplexen | 27 |
| Tab. 6 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ | 27 |
| Tab. 7 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Arginin $5\ 000 - 15\ 000$ | 27 |
| Tab. 8 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $15\ 000 - 70\ 000$ ohne Zugabe von Immunkomplexen | 29 |
| Tab. 9 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $15\ 000 - 70\ 000$ mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Arginin $15\ 000 - 70\ 000$ | 29 |
| Tab. 10 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $15\ 000 - 70\ 000$ mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Arginin $15\ 000 - 70\ 000$ | 29 |
| Tab. 11 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $70\ 000 - 150\ 000$ ohne Zugabe von Immunkomplexen | 31 |
| Tab. 12 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $70\ 000 - 150\ 000$ mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Arginin $70\ 000 - 150\ 000$ | 31 |
| Tab. 13 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin $70\ 000 - 150\ 000$ mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Arginin $70\ 000 - 150\ 000$ | 31 |
| Tab. 14 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 ohne Zugabe von Immunkomplexen | 33 |
| Tab. 15 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1 | 33 |
| Tab. 16 | Meßergebnisse Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1 | 33 |
| Tab. 17 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 ohne Zugabe von Immunkomplexen | 35 |
| Tab. 18 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1 | 35 |
| Tab. 19 | Meßergebnisse Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1 | 35 |
| Tab. 20 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) ohne Zugabe von Immunkomplexen | 37 |
| Tab. 21 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly (Arg, Tyr) | 37 |

| | | |
|---------|--|----|
| Tab. 22 | Meßergebnisse Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly (Arg, Tyr) | 37 |
| Tab. 23 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 ohne Zugabe von Immunkomplexen | 41 |
| Tab. 24 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 mit Zugabe der Immunkompl. nach der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 | 41 |
| Tab. 25 | Meßergebnisse Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 | 41 |
| Tab. 26 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 ohne Zugabe von Immunkomplexen | 43 |
| Tab. 27 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 mit Zugabe der Immunkompl. nach der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 | 43 |
| Tab. 28 | Meßergebnisse Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 | 43 |
| Tab. 29 | Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 ohne Zugabe von Immunkomplexen | 45 |
| Tab. 30 | Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit Zugabe der Immunkompl. nach der Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 | 45 |
| Tab. 31 | Meßergebnisse Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit Zugabe der Immunkompl. vor der Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 | 45 |
| Tab. 32 | Meßergebnisse für DL-Homocystein ohne Zugabe von Immunkomplexen | 49 |
| Tab. 33 | Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von DL-Homocystein | 49 |
| Tab. 34 | Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von DL-Homocystein | 49 |
| Tab. 35 | Meßergebnisse für L-Homocystein ohne Zugabe von Immunkomplexen | 51 |
| Tab. 36 | Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von L-Homocystein | 51 |
| Tab. 37 | Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von L-Homocystein | 51 |
| Tab. 38 | Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von Immunkomplexen | 53 |
| Tab. 39 | Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton | 53 |
| Tab. 40 | Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton | 53 |
| Tab. 41 | Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von Immunkomplexen | 55 |

| | | |
|---------|--|----|
| Tab. 42 | Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton | 55 |
| Tab. 43 | Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton | 55 |
| Tab. 44 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 59 |
| Tab. 45 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} | 59 |
| Tab. 46 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} | 59 |
| Tab. 47 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 61 |
| Tab. 48 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} | 61 |
| Tab. 49 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} | 61 |
| Tab. 50 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 63 |
| Tab. 51 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} | 63 |
| Tab. 52 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} | 63 |
| Tab. 53 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 68 |
| Tab. 54 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} | 68 |
| Tab. 55 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} | 68 |
| Tab. 56 | Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 70 |
| Tab. 57 | Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} | 70 |
| Tab. 58 | Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} | 70 |
| Tab. 59 | Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 72 |
| Tab. 60 | Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} | 72 |
| Tab. 61 | Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} | 72 |
| Tab. 62 | Meßergebnisse für Lysozym ohne Zugabe von Immunkomplexen | 74 |

| | | |
|---------|--|----|
| Tab. 63 | Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Lysozym | 74 |
| Tab. 64 | Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Lysozym | 74 |
| Tab. 65 | Meßergebnisse für Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} ohne Zugabe von Immunkomplexen | 76 |
| Tab. 66 | Meßergebnisse für Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} mit Zugabe der Immunkomplexe nach der Zugabe von Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} | 76 |
| Tab. 67 | Meßergebnisse für Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} mit Zugabe der Immunkomplexe vor der Zugabe von Poly-N5-(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} | 76 |
| Tab. 68 | Pipettierschema für die Versuche 22 - 30 ohne Immunkomplexe | 79 |
| Tab. 69 | Pipettierschema für die Versuche 22 - 30 mit Immunkomplexen | 80 |
| Tab. 70 | Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin _{1 000 - 5 000} ohne Immunkomplexe | 81 |
| Tab. 71 | Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin _{1 000 - 5 000} mit Immunkomplexen | 81 |
| Tab. 72 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} ohne Immunkomplexe | 83 |
| Tab. 73 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} mit Immunkomplexen | 83 |
| Tab. 74 | Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure _{2 000 - 10 000} ohne Immunkomplexe | 85 |
| Tab. 75 | Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure _{2 000 - 10 000} mit Immunkomplexen | 85 |
| Tab. 76 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} ohne Immunkomplexe | 87 |
| Tab. 77 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{5 000 - 15 000} mit Immunkomplexen | 87 |
| Tab. 78 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{2 000 - 15 000} ohne Immunkomplexe | 89 |
| Tab. 79 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{2 000 - 15 000} mit Immunkomplexen | 89 |
| Tab. 80 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{750 - 1500} ohne Immunkomplexe | 91 |
| Tab. 81 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{750 - 1500} mit Immunkomplexen | 91 |
| Tab. 82 | Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 ohne Immunkomplexe | 93 |
| Tab. 83 | Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 mit Immunkomplexen | 93 |
| Tab. 84 | Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin ohne Immunkomplexe | 95 |
| Tab. 85 | Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin mit Immunkomplexen | 95 |
| Tab. 86 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{3 000 - 15 000} ohne Immunkomplexe | 97 |
| Tab. 87 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure _{3 000 - 15 000} mit Immunkomplexe | 97 |

8 Abbildungsverzeichnis

| | Seite | |
|---------|---|----|
| Abb. 1 | Messergebnisse für die Referenzwertbestimmung ohne Zugabe von IC | 23 |
| Abb. 2 | Messergebnisse für die Referenzwertbestimmung mit Zugabe von IC | 24 |
| Abb. 3 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 5 000 - 15 000 ohne Zugabe von IC | 28 |
| Abb. 4 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin 5 000 - 15 000 | 28 |
| Abb. 5 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin 5 000 - 15 000 | 28 |
| Abb. 6 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 ohne Zugabe von IC | 30 |
| Abb. 7 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 | 30 |
| Abb. 8 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin 15 000 - 70 000 | 30 |
| Abb. 9 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 ohne Zugabe von IC | 32 |
| Abb. 10 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 | 32 |
| Abb. 11 | Meßergebnisse für Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Arginin 70 000 - 150 000 | 32 |
| Abb. 12 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 ohne Zugabe von IC | 34 |
| Abb. 13 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1 | 34 |
| Abb. 14 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Ser) 3:1 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly (Arg, Ser) 3:1 | 34 |
| Abb. 15 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 ohne Zugabe von IC | 36 |
| Abb. 16 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1 | 36 |
| Abb. 17 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Trp) 4:1 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly (Arg, Trp) 4:1 | 36 |
| Abb. 18 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) ohne Zugabe von IC | 38 |
| Abb. 19 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly (Arg, Tyr) | 38 |
| Abb. 20 | Meßergebnisse für Poly (Arg, Tyr) mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly (Arg, Tyr) | 38 |
| Abb. 21 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 ohne Zugabe von IC | 42 |
| Abb. 22 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 | 42 |

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 23 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 5 000 - 15 000 | 42 |
| Abb. 24 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 ohne Zugabe von IC | 44 |
| Abb. 25 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 | 44 |
| Abb. 26 | Meßergebnisse für Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Asparaginsäure 15 000 - 50 000 | 44 |
| Abb. 27 | Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 ohne Zugabe von IC | 46 |
| Abb. 28 | Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 | 46 |
| Abb. 29 | Meßergebnisse für Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-DL-Asparaginsäure 2 000 - 10 000 | 46 |
| Abb. 30 | Meßergebnisse für DL-Homocystein ohne Zugabe von IC | 50 |
| Abb. 31 | Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe von IC nach Zugabe von DL-Homocystein | 50 |
| Abb. 32 | Meßergebnisse für DL-Homocystein mit Zugabe von IC vor Zugabe von DL-Homocystein | 50 |
| Abb. 33 | Meßergebnisse für L-Homocystein ohne Zugabe von IC | 52 |
| Abb. 34 | Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe von IC nach Zugabe von L-Homocystein | 52 |
| Abb. 35 | Meßergebnisse für L-Homocystein mit Zugabe von IC vor Zugabe von L-Homocystein | 52 |
| Abb. 36 | Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von IC | 54 |
| Abb. 37 | Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC nach Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton | 54 |
| Abb. 38 | Meßergebnisse für D-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC vor Zugabe von D-Homocystein-Thiolacton | 54 |
| Abb. 39 | Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton ohne Zugabe von IC | 56 |
| Abb. 40 | Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC nach Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton | 56 |
| Abb. 41 | Meßergebnisse für L-Homocystein-Thiolacton mit Zugabe von IC vor Zugabe von L-Homocystein-Thiolacton | 56 |
| Abb. 42 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 ohne Zugabe von IC | 60 |
| Abb. 43 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 | 60 |
| Abb. 44 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin 5 000 - 15 000 | 60 |

| | | |
|---------|---|----|
| Abb. 45 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} ohne Zugabe von IC | 62 |
| Abb. 46 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} | 62 |
| Abb. 47 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin _{30 000 - 70 000} | 62 |
| Abb. 48 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} ohne Zugabe von IC | 64 |
| Abb. 49 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} | 64 |
| Abb. 50 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Ornithin _{100 000 - 200 000} | 64 |
| Abb. 51 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} ohne Zugabe von IC | 69 |
| Abb. 52 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} | 69 |
| Abb. 53 | Meßergebnisse für Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-Glycin _{2 000 - 5 000} | 69 |
| Abb. 54 | Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} ohne Zugabe von IC | 71 |
| Abb. 55 | Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} | 71 |
| Abb. 56 | Meßergebnisse für Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-L-Hydroxyprolin _{5 000 - 20 000} | 71 |
| Abb. 57 | Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} ohne Zugabe von IC | 73 |
| Abb. 58 | Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} | 73 |
| Abb. 59 | Meßergebnisse für Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-DL-Tryptophan _{5 000 - 15 000} | 73 |
| Abb. 60 | Meßergebnisse für Lysozym ohne Zugabe von IC | 75 |
| Abb. 61 | Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe von IC nach Zugabe von Lysozym | 75 |
| Abb. 62 | Meßergebnisse für Lysozym mit Zugabe von IC vor Zugabe von Lysozym | 75 |
| Abb. 63 | Meßergebnisse für Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} ohne Zugabe von IC | 77 |
| Abb. 64 | Meßergebnisse für Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} mit Zugabe von IC nach Zugabe von Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} | 77 |
| Abb. 65 | Meßergebnisse für Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} mit Zugabe von IC vor Zugabe von Poly-N ⁵ -(3-Hydroxypropyl)-L-Glutamin _{15 000 - 30 000} | 77 |

| | | |
|---------|--|----|
| Abb. 66 | Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin $1\ 000 - 5\ 000$ ohne IC | 81 |
| Abb. 67 | Meßergebnisse für Poly-DL-Alanin $1\ 000 - 5\ 000$ mit IC | 82 |
| Abb. 68 | Meßergebnisse für Poly-Glycin $2\ 000 - 5\ 000$ ohne IC | 83 |
| Abb. 69 | Meßergebnisse für Poly-Glycin $2\ 000 - 5\ 000$ mit IC | 84 |
| Abb. 70 | Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$ ohne IC | 85 |
| Abb. 71 | Meßergebnisse für Poly-(α,β)-DL-Asparaginsäure $2\ 000 - 10\ 000$ mit IC | 86 |
| Abb. 72 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ ohne IC | 87 |
| Abb. 73 | Meßergebnisse für Poly-L-Ornithin $5\ 000 - 15\ 000$ mit IC | 88 |
| Abb. 74 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$ ohne IC | 89 |
| Abb. 75 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $2\ 000 - 15\ 000$ mit IC | 90 |
| Abb. 76 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $750 - 1500$ ohne IC | 91 |
| Abb. 77 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $750 - 1500$ mit IC | 92 |
| Abb. 78 | Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 ohne IC | 93 |
| Abb. 79 | Meßergebnisse für Poly (Glu, Ala) 6:4 mit IC | 94 |
| Abb. 80 | Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin ohne IC | 95 |
| Abb. 81 | Meßergebnisse für Poly-L-Tyrosin mit IC | 96 |
| Abb. 82 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ ohne IC | 97 |
| Abb. 83 | Meßergebnisse für Poly-L-Glutaminsäure $3\ 000 - 15\ 000$ mit IC | 98 |

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| Ala | Alanin |
| ApoB | Apoprotein B |
| Arg | Arginin |
| CE | Cholesterinester |
| Glu | Glutamat |
| glyLDL | glykosilierte low density lipoproteins |
| HDL | high density lipoproteins |
| HNE | Hydroxynonenal |
| HSP | heat shock protein |
| HUVECs | human umbilical vein endothelial cells |
| IC | Immunkomplexe |
| ICAM | intercellular adhesion molecule |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IgoxLDL | gegen oxLDL gerichtete Antikörper |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LDL | low density lipoproteins |
| LDL-IC | LDL-enthaltende Immunkomplexe |
| MCP | Monocyte chemoattractant protein |
| MDA | Malondialdehyd |
| MetRS | Methionyl-tRNA-Synthetase |
| Mol. Gew. | Molekulargewicht |
| oxLDL | oxidierte low density lipoproteins |
| ROI | reactive oxigen intermediates |
| Ser | Serin |
| TNF- β | Tumor-Nekrose-Faktor- β |
| Trp | Tryptophan |
| Tyr | Tyrosin |
| VCAM | vascular cell adhesion molecule |

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hartung für die Bereitstellung der Forschungsmittel und des Laborarbeitsplatzes bedanken, die es mir ermöglichten, auf dem interessanten Feld der Immunologie zu arbeiten.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. P. Leskovar bedanken für die Themenstellung und die Betreuung der Arbeit, für die Aufnahme in sein Team und seine stete Bereitschaft, Probleme zu beseitigen und Ideen zu besprechen.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Urologischen Klinik und Poliklinik, deren Tipps die Durchführung vieler Arbeitsschritte enorm erleichtert haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem langjährigen Kollegen und Freund Christian Lorz, mit dem ich über den gesamten Zeitraum der Arbeit sehr gut zusammengearbeitet habe und dessen Teamgeist ich nicht hätte missen wollen.

Nicht minder danken möchte ich an dieser Stelle meiner Frau Christine Stock, die mich vor allem während belastungsintensiver Phasen stets unterstützt hat und mir bei der Korrektur sehr viel Arbeit abgenommen hat, sowie meiner Schwester Marion Stock, die mir bei der Niederschrift und Korrektur wertvolle Anregungen gegeben hat.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stock
 Vorname: Thomas
 Geburtsdatum/-ort: 22.06.1967, München
 Anschrift: Schlüterstraße 15
 80805 München
 Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1973 - 1977 Grundschule in Anzing
 1977 - 1982 Hauptschule in Markt Schwaben, Qualifizierender
 Hauptschulabschluß
 1987 – 1991 München-Kolleg, Abitur

Hochschulbildung

1994 - 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
 Universität in München
 Physikum 24.03.1997 in München
 1. Staatsexamen 31.08.1999 in München
 2. Staatsexamen 14.09.2000 in München
 3. Staatsexamen 16.04.2002 in München

Berufliche Tätigkeiten

9/1982 - 7/1985 Ausbildung zum Kfz-Mechaniker, Gesellenbrief
 8/1985 - 8/1987 Fa. Stahlgruber, Poing, Fabrikarbeiter
 8/1991 - 12/1992 Verein „Glückliches Haus“, Behindertenbetreuer
 1/1993 - 4/1994 Arbeiter Wohlfahrt München, Pflegehilfskraft
 1994 - 2002 Aushilfstätigkeit in verschiedenen Pflegeheimen als
 Pflegehilfskraft
 seit Okt. 2002 Arzt im Praktikum in der Unfallchirurgie, KH Neuperlach