Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Die Proteinkinase A-vermittelte Ekto-Phosphorylierung des Membranproteins FAT/CD36 hemmt die Aufnahme freier Palmitinsäure durch humane Thrombozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Philipp Henning Mähl
aus Hamburg

Dekan:	Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Gutachter:	1. Prof. Dr. Bernd Rüstow
	2. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kroll
	3. Prof. Dr. Ingolf Schimke
Datum der Promotion:	13. Oktober 2003

Meinen Eltern

Prof. Dr. Bernd Rüstow und Dr. Florian Guthmann gilt mein besonderer Dank. Sie haben mein Interesse an der experimentellen Arbeit geweckt und mich jederzeit tatkräftig unterstützt. Ruth Herrmann danke ich stellvertretend für alle Mitarbeiter im Lipidlabor der Klinik für Neonatologie der Charité, Campus Mitte für die gute Zusammenarbeit. Meine Dissertation wurde von der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin im Rahmen der Studentischen Forschungsförderung durch ein Forschungsstipendium unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	8
1.1	Bedeutung langkettiger Fettsäuren im Stoffwechsel von Zellen	8
1.2	Transport langkettiger Fettsäuren durch die Zellmembran	8
1.2.1	Notwendigkeit des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren	8
1.2.2	Flip-Flop-Modell der Transmembran-Diffusion langkettiger Fettsäuren	9
1.2.3	Proteinvermittelter Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren	10
1.2.4	Energieabhängigkeit des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren	12
1.2.5	Proteinvermittelter Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren *in vivo*	13
1.3	Membranständige Transport-Proteine langkettiger Fettsäuren	14
1.4	FAT/CD36	14
1.4.1	Vorkommen von FAT/CD36	15
1.4.2	Molekulare Charakterisierung von FAT/CD36	15
1.4.3	Glykosylierung und Protease-Resistenz von FAT/CD36	16
1.4.4	Struktur-Modell für FAT/CD36	17
1.4.5	Liganden von FAT/CD36	18
1.5	Funktionen von FAT/CD36, Teil 1	20
1.5.1	Immunologische Funktionen von FAT/CD36	20
1.5.2	Aktivierung von Thrombozyten und Angiogenese-Hemmung	20
1.6	Funktionen von FAT/CD36, Teil 2: Lipidstoffwechsel	21
1.6.1	Beteiligung von FAT/CD36 am Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren	21
1.6.2	FAT/CD36 und Lipoprotein-Stoffwechsel	24
1.7	Ekto-Phosphorylierung	24
1.7.1	Substrate und Funktion von Ekto-Proteinkinasen	24
1.7.2	Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36	25
2	**Fragestellung**	26

3	**Material und Methoden**	27
3.1	Material	27
3.2	Methoden	29
3.2.1	Isolierung humaner Thrombozyten	29
3.2.2	Aggregometrische Kontrolle der isolierten Thrombozyten	30
3.2.3	Messung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	30
3.2.4	Bestimmung des Veresterungsgrads der aufgenommenen Palmitinsäure	33
3.2.5	Autoradiografischer Nachweis der Ekto-Proteinphosphorylierung	34
3.2.6	Präparation von Thrombozytenmembranen	34
3.2.7	Deglykosylierung der thrombozytären Proteine	34
3.2.8	Gel-Elektrophorese und Blotting	35
3.2.9	FAT/CD36-Immunoblotting	35
3.2.10	Einsatz von Radiochemikalien	36
3.2.11	Statistik	36
3.3	Verwendete Puffer und Lösungen	37
4	**Ergebnisse**	39
4.1	Isolierung humaner Thrombozyten	39
4.2	Messung der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	41
4.3	Kinetik der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	43
4.3.1	Zeitabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	43
4.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	44
4.4	Untersuchungen zur Regulation der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	47
4.4.1	Kontrollwert der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	48
4.4.2	Einfluss von extrazellulärem cAMP und ATP auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten	49
4.4.3	Bestätigung der Abhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten von der Ekto-Phosphorylierung	50
4.4.4	Abhängigkeit der Hemmung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme von der extrazellulären ATP-Konzentration	51

4.4.5 Reversibilität der phosphorylierungsabhängigen Hemmung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme durch Alkalische Phosphatase 52
4.5 Identifizierung der ektophosphorylierten Proteine 53
4.5.1 Nachweis der Ekto-Proteinphosphorylierung von FAT/CD36 53
4.5.2 Nachweis des ektophosphorylierten Proteins in der Membranfraktion 54
4.5.3 Autoradiografische Bande bei 97 kDa 55
4.5.4 Bestätigung der Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 durch Deglykosylierung 56

5 Diskussion 57
5.1 Etablierung des Modells 57
5.1.1 Isolierung humaner Thrombozyten 58
5.1.2 Kinetik der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten 59
5.2 Einfluss der Bedingungen für eine Ekto-Proteinphosphorylierung auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme 60
5.3 Abhängigkeit der Hemmung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme von der extrazellulären ATP-Konzentration 60
5.4 Zusammenhang zwischen initialer Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten und Ekto-Proteinphosphorylierung 62
5.4.1 Kriterien für den Nachweis einer Ekto-Phosphorylierung 62
5.4.2 Bestätigung der Abhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten von der Ekto-Proteinphosphorylierung 62
5.4.3 Identifizierung der ektophosphorylierten Proteine 63
5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse 66

6 Zusammenfassung 67

7 Literatur 68

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5`-diphosphat
AMP	Adenosin-5`-monophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
β-γ-ATP	Adenosin-[β-γ-methyl]-triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
cAMP	zyklisches Adenosin-3´,5´-monophosphat
CD36	Leukozyten-Differenzierungsfaktor 36 (cluster of differentiation 36)
IgG	Immunglobulin G
FAT	Fettsäure-Translokase (fatty-acid translocase)
FFA	Freie Fettsäure (free fatty acid)
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (high density lipoprotein)
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (low density lipoprotein)
PA	Palmitinsäure (palmitic acid)
PGI_2	Prostaglandin I_2
PKA	Proteinkinase A
PKI *5-24*	Proteinkinase A-Inhibitorpeptid *5-24*
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PPP	Plättchenarmes Plasma (platelet poor plasma)
PRP	Plättchenreiches Plasma (platelet rich plasma)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium-dodecyl-sulfate)
SSM	Sulfo-N-Succinimidyl-Myristat
SSO	Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethyläthylenamin

1 Einleitung

1.1 Bedeutung langkettiger Fettsäuren im Stoffwechsel von Zellen

Langkettige Fettsäuren sind eine wichtige Energiequelle für Zellen und Bausteine für Membranlipide. Als Signalmoleküle können Fettsäuren direkt oder indirekt mit Zellmembranen, Transportmolekülen, Ionenkanälen, Enzymen oder Hormonrezeptoren interagieren und auf diese Weise Zellfunktionen steuern. Langkettige Fettsäuren spielen auch bei Zellwachstum und -differenzierung eine wichtige Rolle. Zunehmend werden sie als intrazelluläre Mediatoren der Genexpression erkannt. Die vielfältigen Aufgaben der Fettsäuren im Organismus machen eine Regulation des Fettsäure-Stoffwechsels, einschliesslich der zellulären Aufnahme und des anschliessenden intrazellulären Transports wahrscheinlich [Abumrad et al. 1999, Dutta-Roy 2000, Reviews].

1.2 Transport langkettiger Fettsäuren durch die Zellmembran

1.2.1 Notwendigkeit des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren

Körperzellen können nicht-essentielle langkettige Fettsäuren *de novo* synthetisieren. Zusätzlich können exogene Fettsäuren aus der Fraktion der „freien“ Fettsäuren aufgenommen werden. Freie Fettsäuren sind unverestert und zirkulieren im Blut an Albumin gebunden. Die für die Phospholipid-Synthese genutzten Fettsäure-Quellen sind unter anderem abhängig von Entwicklungsstand und Ernährungszustand der Zellen [Batenburg et al. 1978, Chander und Fisher 1988]. Beispielsweise wird in adulten TypII-Pneumozyten die maximale Dipalmitoyl-phosphatidylcholin-Synthese (DPPC, Lecithin) nur erreicht, wenn den Zellen ausreichend exogene, freie Palmitinsäure (16:0) zur Verfügung steht [Maniscalco et al. 1989]. Lecithin ist ein oberflächenaktives Lipid und Hauptbestandteil des pulmonalen Surfactant. Die Thromboxan A_2 (TxA_2)-Synthese humaner Thrombozyten ist von der Aufnahme freier Arachidonsäure (20:4) abhängig [Dutta-Roy et al. 1996a]. Beide Beispiele zeigen, dass für elementare Funktionen der Zellen freie, langkettige Fettsäuren die Zellmembran passieren müssen.

Die Vorstellungen bezüglich der Transmembran-Passage langkettiger Fettsäuren haben sich in den letzten Jahren wesentlich weiterentwickelt. Die physiologische Bedeutung der verschiedenen Modelle wird zum Teil kontrovers diskutiert [Hamilton 1998, Abumrad et al. 1998, Reviews].

1.2.2 Flip-Flop-Modell der Transmembran-Diffusion langkettiger Fettsäuren

Die bislang detaillierteste Beschreibung der freien Diffusion langkettiger Fettsäuren durch die Zellmembran stammt von Hamilton [Hamilton 1998] und basiert auf einem physikalisch-chemischen Modell für die Zellmembran-Passage hydrophober Substanzen [Noy et al. 1986]. Hamilton zeigte, dass freie Diffusion stattfindet und ohne zusätzlichen, proteinvermittelten Transport die Fettsäure-Versorgung der Zellen gewährleisten könnte.

Hamilton unterteilte die Zellmembran-Passage langkettiger Fettsäuren in die Abschnitte Adsorption, Transmembranbewegung und Desorption. Nach Hamilton können langkettige Fettsäuren sich ohne Beteiligung eines Proteins von ihren Bindungsstellen am Albumin lösen und sich der äusseren Plasmamembran anlagern („Adsorption“). Allerdings setzte Hamilton bei seinen Untersuchungen hauptsächlich unphysiologisch hohe Konzentrationen extra-zellulärer Fettsäuren ein.

Die „Transmembranbewegung“ langkettiger Fettsäuren wird besonders kontrovers diskutiert. Das Problem der passiven Diffusion durch die hydrophoben Anteile der Zellmembran wird von Hamilton durch einen sogenannten „flip-flop“-Mechanismus der nicht-ionisierten (protonierten) Form der Fettsäuren erklärt. Danach klappen die protonierten Fettsäuren entlang eines Konzentrationsgradienten von der äusseren zur inneren Schicht der Phospholipid-Doppelmembran. Der Fettsäure-Transport über den „flip-flop“-Mechanismus kann nach Hamiltons Ergebnissen mit ausreichender Geschwindigkeit erfolgen, um den Bedarf der Zellen zu decken. Das macht seiner Meinung nach einen zusätzlichen, proteinvermittelten Transportmechanismus überflüssig. Es gibt aber Einwände anderer Autoren, welche die durch „flip-flop“ erreichbare maximale Transfergeschwindigkeit für nicht ausreichend für den Metabolismus einiger Zelltypen halten. Als Beispiel werden Myozyten angeführt [Kleinfeld et al. 1997].

Auch von der inneren Plasmamembran in den Intrazellularraum („Desorption“) können langkettige Fettsäuren nach Hamilton ohne Protein-Beteiligung gelangen. Dem steht das gut untersuchte Konzept der intrazellulären Fettsäure-bindenden Proteine gegenüber („fatty-acid binding proteins“, FABP). Sie dienen der Fettsäure-Aufnahme an der inneren Zellmembran und dem intrazellulären Fettsäure-Transport [Storch und Thumser 2000, Review].

1.2.3 Proteinvermittelter Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren

Zahlreiche Studien belegen den proteinvermittelten Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren [Abumrad et al. 1998]. Das Konzept der freien Diffusion als einziger Möglichkeit der Zellmembran-Passage langkettiger Fettsäuren ist damit nicht aufrecht zu erhalten. Die Fettsäure-Aufnahme vieler Zelltypen zeigt die kinetischen Eigenschaften des erleichterten Transports [Dutta-Roy 2000, Review], darunter Adipozyten [Abumrad et al. 1984], Hepatozyten, Skelett- und Herzmuskulatur [Sorrentino et al. 1988, Goresky et al. 1994], humane Caco2-Darmzellen [Trotter et al. 1996] und TypII-Pneumozyten [Maniscalco et al. 1990, Guthmann et al. 1999]. Die bisherigen Untersuchungen zur Hemmbarkeit der Fettsäure-Aufnahme durch proteinmodifizierende Substanzen lassen darauf schliessen, dass der erleichterte Transport den überwiegenden Anteil an der gesamten Aufnahme langkettiger Fettsäuren ausmacht [Abumrad et al. 1998].

1.2.3.1 Sättigbarkeit der Aufnahme langkettiger Fettsäuren

Die ersten Argumente für proteinvermittelten Fettsäure-Transport lieferten Studien an isolierten Ratten-Adipozyten. Abumrad und Co-Autoren zeigten, dass die Fettsäure-Aufnahme einer nicht-linearen Sättigungskinetik in Abhängigkeit von der Konzentration freier Fettsäuren folgt [Abumrad et al. 1981, Abumrad et al. 1984]. Bei erleichtertem Transport erwartet man den K_m-Wert (Michaeliskonstante) im physiologischen Konzentrationsbereich des Substrats. Die Konzentration freier Fettsäuren im Equilibrium mit proteingebundenen Fettsäuren war bis vor wenigen Jahren schwierig zu bestimmen, weil man die beiden Fraktionen praktisch nicht getrennt messen konnte. Abhilfe schaffte die Entwicklung des Fluoreszenz-basierten Verfahrens „ADIFAB“ [Richieri et al. 1993]. Korrigiert man die Werte aus Abumrads Studien durch die mit Richieris Methode ermittelten Konzentrationen, liegt der K_m -Wert für den Fettsäure-Transport bei 7 nM und damit tatsächlich im physiologischen Konzentrationsbereich freier Fettsäuren im Plasma (7,5 nM ± 2,5 nM) [Richieri und Kleinfeld 1995]. In diesem Konzentrationbereich wird fast die gesamte Fettsäure-Aufnahme der Zellen durch die sättigbare Komponente erklärt. Die lineare, diffusionsartige Komponente scheint erst bei höheren Konzentrationen an freier Fettsäure relevant zu werden, beispielsweise unter den Bedingungen der intravaskulären Lipolyse [Abumrad et al. 1981].

Auch der Palmitinsäure-Transport über sarkolemmale Membranvesikel („giant vesicles“) ist sättigbar, der K_m -Wert beträgt 6 nM [Bonen et al. 1998]. Das Modell der Membranvesikel ist besonders interessant, weil kein intravesikulärer Metabolismus die Fettsäure-Aufnahme beeinflussen kann.

1.2.3.2 Kompetitive Hemmung verschiedener langkettiger Fettsäuren

In Studien mit isolierten Adipozyten [Abumrad et al. 1984], Hepatozyten und an der perfundierten Rattenleber [Sorrentino et al. 1996] konnte die kompetitive Hemmung der zellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren gezeigt werden, beispielsweise zwischen Ölsäure (18:1) und Palmitinsäure (16:0). Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für die Existenz des sättigbaren, proteinvermittelten Transports. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren (bis 8 C-Atome) zeigen keine kompetitive Hemmung [Abumrad et al. 1984], was auf eine Substratspezifität der am Transmembran-Transport beteiligten Proteine hindeutet.

1.2.3.3 Hemmbarkeit der Fettsäure-Aufnahme durch proteinmodifizierende Substanzen

Die Hemmbarkeit durch proteinmodifizierende Substanzen ist ein wichtiges biochemisches Argument für die proteinvermittelte Aufnahme langkettiger Fettsäuren. An Ratten- und humanen Adipozyten lässt sich die Fettsäure-Aufnahme durch Phloretin, einen Inhibitor von Glukose- und Anionen-Transportern, reversibel hemmen [Abumrad et al. 1981, Abumrad et al. 1984]. Der Anionen-Inhibitor Diisothiodisulfonische Säure (DIDS) [Harmon et al. 1992] sowie die reaktiven Fettsäurederivate Sulfo-N-Succinimidyl-Oleat (SSO) und -myristat (SSM) hemmen die Aufnahme irreversibel [Harmon und Abumrad 1993, Harmon et al. 1991]. SSO ist ein spezifischer Hemmstoff für das membranständige Glykoprotein FAT/CD36 [Harmon et al. 1991]. An TypII-Pneumozyten der Ratte senken Phloretin, SSO und Bromobiman die Palmitinsäure-Aufnahme [Guthmann et al. 1999]. Bromobiman reagiert mit Thiolgruppen von Membranproteinen [Kosower und Kosower 1987]. In Hepatozyten hemmt das Fettsäurederivat 11-Azistearat irreversibel und selektiv die Fettsäure-Aufnahme [Schmider et al. 1996]. Die Mehrzahl der hemmenden Substanzen sind als Anionen-Inhibitoren bekannt. Das könnte ein Hinweis auf funktionelle Parallelen zwischen Fettsäure- und Anionen-Transportern sein.

Auch proteolytische Enzyme hemmen die Fettsäure-Aufnahme, wie unter anderem an Adipozyten nach Pronase- und an Kardiomyozyten nach Trypsin-Behandlung nachgewiesen wurde [Abumrad et al. 1984, Luiken et al. 1997]. An 3T3-L1-Adipozyten wurde gezeigt, dass die schnelle, sättigbare Komponente der Fettsäure-Aufnahme durch eine vorhergehende Hitze-Denaturierung oder Protease-Behandlung reduziert wird [Trigatti et al. 1991].
Die proteinmodifizierenden Substanzen hemmten in den bisherigen Studien jeweils den überwiegenden Teil der Fettsäure-Aufnahme (54-98 %) [Abumrad et al. 1998, Review], was die Bedeutung der proteinvermittelten Komponente des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren unterstreicht.

1.2.3.4 Hemmbarkeit der Fettsäure-Aufnahme durch Antikörper

Auch durch gegen bestimmte Membranproteine gerichtete Antikörper wurde die zelluläre Fettsäure-Aufnahme gehemmt. Ein Antikörper gegen die Aspartat-Aminotransferase verminderte die Ölsäure-Aufnahme von Hepatozyten und Adipozyten [Berk et al. 1990a, Zhou et al. 1992]. Ein gegen FAT/CD36 gerichteter, monoklonaler Antikörper verminderte die Arachidonsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten [Dutta-Roy et al. 1996b]. Diese Ergebnisse belegen die Beteiligung spezifischer Membranproteine am Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren.

1.2.4 Energieabhängigkeit des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren

ATP-Depletion führte zu über 50 % Hemmung der Ölsäure-Aufnahme von Ratten-Hepatozyten [Stremmel et al. 1986]. Die durch das Membranprotein FAT/CD36 vermittelte Palmitinsäure-Aufnahme von TypII-Pneumozyten der Ratte wurde durch ATP-Depletion reversibel um 65 % gesenkt. Durch Inkubation der TypII-Pneumozyten bei 0 °C wurde die Aufnahme fast vollständig gehemmt [Guthmann et al. 1999]. Die Fettsäure-Aufnahme ist demnach in beiden Beispielen zumindest teilweise sättigbar und energieabhängig. Die Energieabhängigkeit spricht für eine aktive Fettsäure-Aufnahme und gegen einen ausschliesslich passiven Diffusionsprozess langkettiger Fettsäuren.
Kalium-Depletion zeigte keine Wirkung auf die Palmitinsäure-Aufnahme von TypII-Pneumozyten der Ratte. Das deutet darauf hin, dass der Vorgang unabhängig von der kaliumabhängigen Bildung von „coated pits“ und endocytotischen Vesikeln ist [Guthmann et al. 1999].

1.2.5 Proteinvermittelter Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren *in vivo*

Die Bedeutung des proteinvermittelten Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren *in vivo* ist in der Vergangenheit trotz der überzeugenden *in vitro*-Nachweise kontrovers diskutiert worden. Verschiedene Ansätze zeigen, dass das membranständige Glykoprotein FAT/CD36 am proteinvermittelten Fettsäure-Transport *in vivo* beteiligt ist. So verstärkte die muskelspezifische Überexpression von FAT/CD36 die Fettsäure-Oxydation kontrahierender Muskulatur und senkte die Konzentration von Triglyceriden und freien Fettsäuren im Plasma [Ibrahimi et al. 1999]. FAT/CD36-„knock-out“-Mäuse (FAT/CD36-[-/-]) zeigten in Muskel- und Fettgewebe eine verminderte Aufnahme und Verwertung langkettiger Fettsäuren [Febbraio et al. 1999, Coburn et al. 2000]. FAT/CD36-defiziente Menschen reicherten im Myokard keine radiomarkierten, langkettigen Fettsäuren an [Nozaki et al. 1999].

Die freie Diffusion langkettiger Fettsäuren durch die Zellmembran wurde gezeigt. Darüber hinaus belegen zahlreiche Studien die Beteiligung von Proteinen am Transport langkettiger Fettsäuren durch die Zellmembran *in vitro* und *in vivo*. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass der proteinvermittelte Transport bei physiologischen Fettsäure-Konzentrationen den überwiegenden Anteil an der gesamten Fettsäure-Aufnahme ausmacht. Verschiedene am transmembranären Fettsäure-Transport beteiligte Proteine sind bereits identifiziert worden.

1.3 Membranständige Transport-Proteine langkettiger Fettsäuren

Bisher sind folgende membranständige Proteine identifiziert worden, die langkettige Fettsäuren binden:

1. das „Plasma membrane fatty-acid binding protein“ ($FABP_{pm}$, 43 kDa) [Stremmel et al. 1985], es entspricht einer membran-assoziierten Form der mitochondrialen Aspartat-Aminotransferase [Berk et al. 1990b].
2. das „Fatty-acid transporter protein“ (FATP, 63 kDa) [Stremmel et al. 1983, Schaffer und Lodish 1994] mit hochgradiger Sequenz-Übereinstimmung mit der „Very long chain fatty-acid Acyl-CoA synthetase“ [Uchiyama et al. 1996];
3. der renale „Fatty-acid receptor“ (FAR, 56-60 kDa) [Fujii et al. 1987];
4. ein membran-assoziiertes „Fatty-acid binding protein“ (FABP, 22 kDa) [Trigatti et al. 1991], welches „Caveolin-1“ entspricht [Trigatti et al. 1999]; und
5. die „Fatty-acid translocase“ (FAT/CD36, 88 kDa) [Abumrad et al. 1981, Abumrad et al. 1984].

Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen steht die „Fatty-acid translocase“ (FAT/CD36). FAT/CD36 wird in Herz- und Skelettmuskelzellen der Ratte gemeinsam mit dem cytoplasmatischen „Fatty-acid binding protein“ (FABP) exprimiert [Van-Nieuwenhoven et al. 1995]. Die Co-Expression von FAT/CD36 und FABP stimuliert die Fettsäure-Aufnahme und -Verstoffwechselung [Murphy et al. 1996]. Die Beteiligung von FAT/CD36 am Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren gilt als gesichert.

1.4 FAT/CD36

Ein Membranprotein von Mamma-Epithelzellen fiel Kobylka durch grosse Proteolyse-Resistenz auf [Kobylka und Carraway 1973]. Es wurde später als FAT/CD36 identifiziert. FAT/CD36 wurde zuerst aus humanen Thrombozyten isoliert und seine Struktur analysiert [Tandon et al. 1989]. Andere gebräuchliche Bezeichnungen für die „Fatty-acid Translocase“ (FAT) [Harmon et al. 1991] sind GPIV [Okumura und Jamieson 1976], GPIIIb [Clemetson et al. 1977] (Glykoprotein IV/IIIb) und Leukozyten-Differenzierungsfaktor CD36 („Cluster of Differentiation 36“) [Greenwalt et al. 1992, Review].

1.4.1 Vorkommen von FAT/CD36

FAT/CD36 wurde unter anderem nachgewiesen in Adipozyten [Abumrad et al. 1993], Epithelzellen der Brust [Clezardin et al. 1993], Darm und Retina [Ryeom et al. 1996] sowie TypII-Pneumozyten [Guthmann et al. 1999], in der Herz- und Skelettmuskulatur [Van-Nieuwenhoven et al. 1995] und in hämatopoetischen Zellen, darunter erythroide Vorläuferzellen, Thrombozyten [Tandon et al. 1989], Monozyten und Megakaryozyten [Silverstein und Febbraio 2000, Review].

Bei der Isolation von Caveolae-Proteinen wird auch FAT/CD36 isoliert [Babitt et al. 1997]. Caveolae sind cholesterin- und sphingolipidreiche spezialisierte Mikrodomänen der Zellmembran. Man diskutiert ein funktionelles Zusammenwirken von Caveolae und FAT/CD36 bei der Cholesterin-Aufnahme und in Signalkaskaden [Uittenbogaard et al. 2000]. Caveolae werden aber nicht als notwendig für die Funktionen von FAT/CD36 betrachtet. Bestimmte Makrophagen-Linien beispielsweise exprimieren funktionelles FAT/CD36, obwohl sie keine Caveolae ausprägen [Matveev et al. 1999].

1.4.2 Molekulare Charakterisierung von FAT/CD36

FAT/CD36 gehört zur Familie der Scavenger-Rezeptoren der Klasse B [Rigotti et al. 1995]. Gemeinsames Merkmal der Rezeptoren-Familie ist die Bindung oxidierter Lipoproteine geringer Dichte („low density lipoproteins“, LDL), apoptotischer Zellen und anionischer Phospholipide. Die strukturelle Ähnlichkeit besteht in zwei Transmembran-Domänen und einer grossen, stark glykosylierten, extrazellulären Domäne. Zu dieser in den letzten Jahren beschriebenen Rezeptoren-Familie gehören neben FAT/CD36 auch LIMP-II („rat lysosomal integral membrane protein II“ [Vega et al. 1991], ein lysosomaler Rezeptor mit bislang unbekannter Funktion, und SR-BI („scavenger receptor class B type 1“), ein Lipoprotein-(„high density lipoproteins“-, HDL-) Rezeptor [Fluiter und van Berkel 1997], der an der selektiven, hepatischen Vitamin E- und Cholesterin-Aufnahme beteiligt ist [Witt et al. 2000].

Das FAT/CD36-Gen wurde auf dem humanen Chromosom 7q11.2 lokalisiert [Fernandez-Ruiz et al. 1993], bei Ratte und Maus auf den Chromosomen 4 beziehungsweise 5. Die cDNA von humanem, placentalem FAT/CD36 konnte durch Klonen in COS-Zellen amplifiziert und isoliert werden [Oquendo et al. 1989]. Die Nukleotidsequenz entspricht einem Protein mit 471 Aminosäuren und einer erwarteten molekularen Masse von 53 kDa.

Die Primärstruktur und die grundlegende Membran-Topographie von FAT/CD36 sind konserviert und zeigen hochgradige Sequenz-Übereinstimmung bei allen untersuchten Säugetieren; stark verwandte Formen sind bei der Fruchtfliege Drosophila [Franc et al. 1996], und an Nematoden beschrieben worden [Silverstein und Febbraio 2000, Review]. Die primären Aminosäure-Sequenzen von FAT/CD36 verschiedener Zelltypen innerhalb einer Spezies zeigen einen hohen Grad an Übereinstimmung [Greenwalt et al. 1992, Review].

1.4.3 Glykosylierung und Protease-Resistenz von FAT/CD36

Die tatsächlich ermittelte Masse von FAT/CD36 liegt deutlich über den von der Aminosäure-Sequenz abgeleiteten 53 kDa. Die elektrophoretisch bestimmte Masse von humanem, thrombozytären FAT/CD36 beträgt 88 kDa [Tandon et al. 1989], für humane Mamma-Epithelzellen findet man 85 kDa [Greenwalt et al. 1990] und für Erythroblasten 78 kDa [Kieffer et al. 1989]. Die starke Glykosylierung des Proteins an zehn postulierten Glykosylierungsstellen erklärt die Diskrepanz zur erwarteten Masse. Die unterschiedliche Masse in verschiedenen Zelltypen wird auf zelltyp-spezifische Glykosylierung zurückgeführt. Nach Deglykosylierung mit Endoglykosidase F finden sich identische Molekularmassen [Greenwalt et al. 1992, Review].

Humanes, thrombozytäres FAT/CD36 hat sowohl alkali-labile O-glykosidische als auch N-glykosidische Bindungen. Man vermutet, dass die starke und komplexe Glykosylierung der „scavenger class B“-Rezeptoren die Proteine in proteolytisch aktiven Kompartimenten wie den Lysosomen (LIMB II) und in der Umgebung von Gewebeschäden und Entzündungs-reaktionen vor der Zersetzung schützt [Silverstein und Febbraio 2000]. Tatsächlich kann das FAT/CD36-Polypeptid leicht von Proteasen zersetzt werden, wenn die N-gebundenen Oligosaccharide enzymatisch entfernt worden sind [Greenwalt et al. 1991]. Der Stabilisierung des Proteins durch die N-gebundenen Oligosaccharide dürfte eine grosse Bedeutung zukommen, da FAT/CD36 zum Beispiel in Blut und Muttermilch hohen Konzentrationen endogener Proteasen ausgesetzt ist.

1.4.4 Struktur-Modell für FAT/CD36

Anhand der Aminosäure-Sequenz wurden Modelle für die Primärstruktur des Proteins entwickelt. Pearce und Co-Autoren beschreiben den C-terminalen Abschnitt als einzige Verankerung in der Zellmembran, das N-terminale Ende des Proteins liegt in ihrem Modell extrazellulär. Sie beobachteten die Sekretion von CD36ΔCT, einer Mutante des Proteins, der am C-terminalen Ende die hydrophobe Domäne und der cytoplasmatische Abschnitt fehlen [Pearce et al. 1994]. Tao und Co-Autoren konnten jedoch in einer anderen Studie mit der Zelllinie „293“ die Sekretion von CD36ΔCT nicht bestätigen, sondern fanden das Protein ausschliesslich in der Membranfraktion. Daraus schliessen sie, dass auch der N-terminale Abschnitt von FAT/CD36 eine Membranverankerung darstellt [Tao et al. 1996].

Im heute allgemein akzeptierten Modell gibt es zwei hydrophobe Abschnitte von je etwa 22 Aminosäuren nahe den N- und C-terminalen Enden, welche die Transmembran-Domänen darstellen. Sie werden flankiert von sechs bis elf endständigen Aminosäuren, den cytoplasmatischen Domänen [Greenwalt et al. 1992, Febbraio et al. 2001, Reviews].

Nahe den kurzen, N- und C-terminalen, cytoplasmatischen Enden ist FAT/CD36 an den Cysteinen 2, 6, 463 und 465* palmitoyliert [Tao et al. 1996]. Palmitoylierung bedeutet die post-translationale, kovalente Thioester-Bindung meist einer Palmitinsäure an ein Cystein und kommt bei Proteinen nur an cytoplasmatischen Domänen oder direkt an der Grenze zwischen innerer Membranschicht und Cytoplasma vor [Sefton und Buss 1987, Schlesinger et al. 1994]. Die von Tao nachgewiesenen Eigenschaften stimmen mit dem von Greenwalt und Co-Autoren entwickelten Struktur-Modell für FAT/CD36 überein.

Zwischen den beiden Membranverankerungen befindet sich der grosse, extrazelluläre Abschnitt von FAT/CD36. Die extrazelluläre Domäne bildet möglicherweise eine Haarnadelfigur [Abumrad et al. 1993], bedingt durch eine weitere potentiell membran-assoziierte Domäne auf der N-seitigen Hälfte zwischen den Aminosäuren 184 und 204 [Greenwalt et al. 1992].

---

* Die Numerierung der Aminosäure-Positionen von FAT/CD36 richtet sich in dieser Arbeit durchgängig nach den Angaben in „Swiss-Prot“ (Version 40.36). Von einigen der zitierten Autoren wird abweichend ein N-terminales Methionin als erste Aminosäure mitgezählt, wodurch sich ihre Angaben der Positionen jeweils um 1 von „Swiss-Prot“ unterscheiden. In diesen Fällen wurde gemäss „Swiss-Prot“ korrigiert.

1.4.5 Liganden von FAT/CD36

Der extrazelluläre Abschnitt von FAT/CD36 wird durch zehn hauptsächlich N-seitige Glykosylierungsstellen charakterisiert, deren starke Glykosylierung und Rolle für die Proteolyse-Resistenz bereits erwähnt wurde.

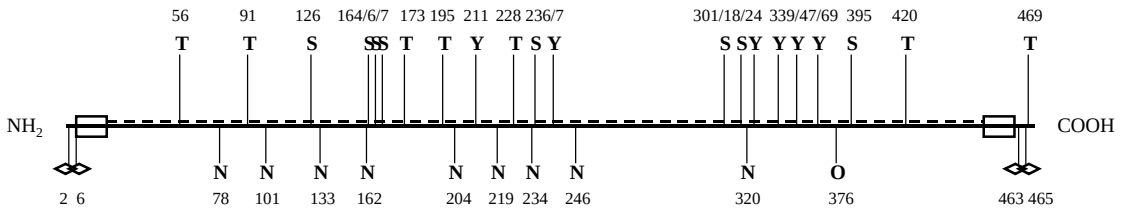
Die Aminosäuren (AS) 93 bis 120 bilden eine hochaffine Bindungsstelle für Thrombospondin 1 (TSP-1), möglicherweise moduliert durch die „downstream"-Sequenz AS 139 bis 155.

Bindungsstellen für oxidierte Lipoproteine (oxLDL) wurden an den Epitopen AS 28 bis 93 und 120 bis 155 gefunden. Eine Bindungsstelle für apoptotische Zellen und für mit dem Malaria-Erreger Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten wird im Epitop AS 155 bis 183 vermutet. Monoklonale Antikörper hemmen die entsprechenden Bindungen [Febbraio et al. 2001, Review].

Die Sequenz-Analyse durch die Bioinformatik-Datenbanken „Swiss-Prot" (Version 40.36) und „NetPhos" (Version 2.0) zeigt neben der an humanen Thrombozyten bereits nachgewiesenen, Threonin-gebundenen Phosphorylierungsstelle an der Aminosäure-Position 91 [Asch et al. 1993] weitere potentielle Phosphorylierungsstellen* von FAT/CD36. Die Aminosäure-Sequenz von humanem FAT/CD36 wurde „Swiss-Prot" entnommen und anschliessend durch „NetPhos" mittels der automatisierten Analyse von Sequenz- und Strukturmerkmalen auf potentielle Phosphorylierungsstellen untersucht [Blom et al. 1999]. „NetPhos" findet für humanes FAT/CD36 insgesamt acht Serin-gebundene potentielle Phosphorylierungsstellen an den Positionen 126, 164, 166, 167, 236, 301, 318 und 395, sieben Threonin-gebundene (Positionen 56, 91, 173, 195, 228, 420, 469) und sechs Tyrosin-gebundene (Positionen 211, 237, 324, 339, 347, 369). Abbildung 1 zeigt schematisch ausgewählte Strukturmerkmale von FAT/CD36.

---

* Als potentielle Phosphorylierungsstellen gibt „NetPhos" Aminosäure-Positionen mit einem Vorhersagewert („prediction score") ≥ 0,5 an [Blom et al. 1999].



▭	Transmembran-Domänen (AS 7-28 und 439-460)
- - - -	Extrazelluläre Domäne (AS 29-438)
S,T,Y	Phosphorylierungs-Stellen (**S**erin-, **T**hreonin- oder T**y**rosingebunden)
N,O	**N**- oder **O**-glykosidische Bindungs-Stellen
◇	Palmitoylierungs-Stellen
1-471	Position der Aminosäure

Abb. 1 Strukturmerkmale von FAT/CD36

nach: Swiss-Prot (Version 44.36) und NetPhos (Version 2.0)

1.5 Funktionen von FAT/CD36, Teil 1

1.5.1 Immunologische Funktionen von FAT/CD36

FAT/CD36 ist ein multifunktionelles Protein. In Experimenten mit mononukleären Phagozyten wurde die Erkennung apoptotischer Zellen durch FAT/CD36 beschrieben [Savill et al. 1991]. Die Beteiligung von FAT/CD36 an der physiologischen Phagozytose ist auch von Photorezeptor-Segmenten der Retina bekannt, ebenso eine Funktion von FAT/CD36 bei der Präsentation körperfremder Antigene im Rahmen der spezifischen Abwehr. Da FAT/CD36 Oberflächenveränderungen von Erythrozyten durch Plasmodium falciparum-Infektionen oder durch Hämoglobin S erkennt, wird eine Rolle des Proteins bei der Pathogenese von Malaria und Sichelzellanämie diskutiert. Die immunologischen Funktionen von FAT/CD36 werden in einer Übersichtsarbeit von Febbraio und Co-Autoren ausführlich besprochen [Febbraio et al. 2001, Review].

1.5.2 Aktivierung von Thrombozyten und Angiogenese-Hemmung

FAT/CD36 wurde erstmalig von Tandon und Mitarbeitern aus humanen Thrombozyten isoliert [Tandon et al. 1989]. Dem Protein wird als Rezeptor für die adhäsiven Proteine Thrombospondin-1 (TSP-1) und Kollagen eine wichtige Rolle bei der Thrombozyten-Aktivierung und -Aggregation zugeschrieben [Asch et al. 1987, Clemetson 1995, Review].
FAT/CD36 wird als Vermittler der anti-angiogenetischen Aktivität von TSP-1 angesehen [Febbraio et al. 2001]. Von der Aufklärung dieses Mechanismus erhofft man sich neue therapeutische Ansätze zur Bekämpfung von Tumoren, der diabetischen Retinopathie und anderer Krankheiten, an deren Entstehung die Angiogenese beteiligt ist.

1.6 Funktionen von FAT/CD36, Teil 2: Lipidstoffwechsel

1.6.1 Beteiligung von FAT/CD36 am Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren

Im folgenden sollen die verschiedenen experimentellen Ansätze und Ergebnisse zusammengefasst werden, die zum Nachweis der Beteiligung von FAT/CD36 an der zellulären Aufnahme freier, langkettiger Fettsäuren beigetragen haben.

1.6.1.1 Strukturelle Merkmale von FAT/CD36

Abumrad und Co-Autoren zeigten an humanen und Ratten-Adipozyten die kovalente Bindung der monofunktionellen, reaktiven Ester langkettiger Fettsäuren SSM und SSO an ein Membranprotein von 88 kDa. Durch die Bindung dieser Fettsäurederivate wurde die Fettsäure-Aufnahme irreversibel gehemmt. Daraufhin wurde das Protein „Fatty-acid translocase“ (FAT) genannt [Harmon et al. 1991, Abumrad et al. 1993]. FAT konnte später aus Ratten-Adipozyten isoliert und sequenziert werden und zeigte 85 % Sequenz-Übereinstimmung mit CD36 humaner Thrombozyten [Harmon und Abumrad 1993]. Isoliertes FAT/CD36 bindet die langkettigen Fettsäuren Öl-, Palmitin-, Stearin-, Arachidon- und Linolsäure [Baillie et al. 1996], aber nicht die mittelkettige Octansäure (8 C-Atome), was mit der Spezifität des Fettsäure-Transports in Ratten-Adipozyten übereinstimmt [Abumrad et al. 1981, Abumrad et al. 1984]. Es besteht 73 % Sequenz-Übereinstimmung eines extrazellulären Segments von FAT/CD36 (AS 127-279) mit der Fettsäure-bindenden Domäne des cytosolischen „Fatty-acid binding protein“ (FABP) [Banaszak et al. 1994, Baillie et al. 1996]. Die Aminosäuren, die beim FABP mit den geladenen Kopfgruppen der Fettsäuren reagieren, sind in FAT/CD36 als Arg-272 und Tyr-275 konserviert.

1.6.1.2 Zelldifferenzierung und Fettsäure-Aufnahme

Die Differenzierung von Prä-Adipozyten in Adipozyten induziert die Expression von FAT/CD36-mRNA (Marker-Funktion von FAT/CD36). Die vermehrte Expression des Proteins geht mit der gesteigerten Aufnahme langkettiger Fettsäuren einher. Die dadurch erhöhte intrazelluläre Fettsäure-Konzentration induziert die mRNA-Expression anderer am Fettsäure-Metabolismus beteiligter Proteine und die weitere Differenzierung der Zellen [Amri et al. 1991, Grimaldi et al. 1992]. Die Induktion der Zelldifferenzierung durch Fettsäuren und eine Co-Regulation von FAT/CD36 und muskulärem FABP während der Organentwicklung wurde auch für humane Kardiomyozyten gezeigt [Van-Nieuwenhoven et al. 1996, Glatz et al.

1997]. Bei Adaption an die Bedingungen chronischer Lipolyse, also bei einem Überangebot freier Fettsäuren, wird FAT/CD36 in Adipozyten vermindert exprimiert [Sfeir et al. 1997].

1.6.1.3 Verteilung der FAT/CD36-Expression

FAT/CD36 findet sich bevorzugt in Zellen, in denen Lipide gespeichert werden oder in denen langkettige Fettsäuren wichtige Substrate des Stoffwechsels darstellen, wie Adipozyten, Herz- und Skelettmuskel, Thrombozyten und TypII-Pneumozyten [Abumrad et al. 1999, Guthmann et al. 1999]. Innerhalb des Muskelgewebes ist die Expression stark erhöht, wo rote, oxidativ aktive Fasern dominieren [Van-Nieuwenhoven et al. 1996, Bonen et al. 1998]. Im Darm findet sich FAT/CD36 vor allem im Jejunum, wo der Großteil der Fettsäuren resorbiert wird, und wird dort bei erhöhtem Fettsäure-Angebot vermehrt exprimiert [Poirier et al. 1996, Prieto et al. 1996]. Im Gehirn, wo keine exogenen Fettsäuren verstoffwechselt werden, wurde FAT/CD36 nicht nachgewiesen [Abumrad et al. 1993], und in Lebergewebe, für das $FABP_{pm}$ als hauptsächliches Fettsäure-Transportprotein postuliert wird, findet sich nur wenig FAT/CD36 [Berk et al. 1987].

1.6.1.4 Spezifische experimentelle Nachweise des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren durch FAT/CD36

Es gibt neben den oben genannten Ergebnissen bereits spezifische Nachweise für die Beteiligung von FAT/CD36 am Transport langkettiger Fettsäuren. Ein monoklonaler, gegen FAT/CD36 gerichteter Antikörper hemmte die Arachidonsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten [Dutta-Roy et al. 1996b]. Wurden Ob17PY-Fibroblasten, die normalerweise kein FAT/CD36 exprimieren, mit FAT/CD36-cDNA transfiziert, liess sich eine zuvor nicht vorhandene Komponente der Aufnahme langkettiger Fettsäuren nachweisen, die sättigbar, hochaffin (K_m = 4 nM) und durch den Anionen-Inhibitor Phloretin hemmbar war [Ibrahimi et al. 1996]. Bei einem Verhältnis der gesamten Fettsäure zum humanen Serumalbumin (HSA) von 0,2- 0,7, was den normalen physiologischen Bedingungen entspricht (FFA:HSA $\leq$ 1,0) [Spector 1975], machte diese proteinabhängige Komponente etwa 75 % der Fettsäure-Aufnahme aus. Die Ergebnisse stimmen mit Charakteristika des Fettsäure-Transports von Ratten-Adipozyten überein [Abumrad et al. 1981]. Sie lassen die Schlussfolgerung zu, dass bei physiologischen Konzentrationen an freier Fettsäure erst die Expression von FAT/CD36 den Zellen eine effektive Fettsäure-Aufnahme erlaubt.

Auch für Muskelgewebe wird die Beteiligung von FAT/CD36 an der Fettsäure-Aufnahme beschrieben. In sarkolemmalen Vesikeln sind FAT/CD36-Expression (sowohl mRNA als auch Protein) und Fettsäure-Transport nach experimentell simulierter Dauerstimulation des Muskels erhöht [Bonen et al. 1999].

1.6.1.5 Zelluläre Expression und Translokation von FAT/CD36

Tontonoz und Co-Autoren beschreiben einen Zusammenhang der zellulären FAT/CD36-Expression mit dem Lipoprotein-Stoffwechsel [Tontonoz et al. 1998]. Bei erhöhtem Angebot an oxLDL stimulierten der nukleäre Hormonrezeptor „Peroxisome proliferator-activated receptor γ“ (PPARγ) und seine Liganden die Transkription und membranständige Expression von FAT/CD36 humaner Monozyten. Die FAT/CD36-„Promotor“-Region wurde als direkte Zielsequenz identifiziert. Die erhöhte Bindungs- und Aufnahmekapazität der Zellen für oxLDL konnte hauptsächlich auf die verstärkte FAT/CD36-Expression zurückgeführt werden. Kolleck und Co-Autoren beobachteten an TypII-Pneumozyten der Ratte eine Umverteilung von FAT/CD36 aus dem Cytosol in die Membranfraktion bei erhöhter intrazellulärer Cholesterin-Konzentration. Mit der FAT/CD36-Translokation ging eine gesteigerte Palmitinsäure-Aufnahme einher [Kolleck et al. 2002].

1.6.1.6 Erkenntnisse aus *in vivo*-Studien zur Beteiligung von FAT/CD36 am Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren

Transgene Mäuse mit erhöhter FAT/CD36-Expression im Muskelgewebe haben einen schlanken Phänotyp, wenig Fettgewebe und niedrige Triglycerid- und Fettsäurespiegel im Plasma. Ihre Muskulatur (M. soleus) zeigte bei Stimulation deutlich erhöhte Fettsäure-Oxidation [Ibrahimi et al. 1999]. In murinen Kardiomyozyten wurde mehrfach verstärkt FAT/CD36 exprimiert, wenn den Tieren eine fettreiche Diät verabreicht wurde, ebenso in den Kardiomyozyten muriner Diabetes-Modelle [Greenwalt et al. 1995]. Der limitierende Faktor für den Fettsäure-Umsatz von Myozyten scheint demnach die proteinvermittelte Aufnahme exogener Fettsäuren über die Zellmembran zu sein. Diese lässt sich durch erhöhte FAT/CD36-Expression steigern.

Am Menschen wurden bislang zwei Typen von FAT/CD36-Defizienz durch genetische Mutationen beschrieben [Kashiwagi et al. 1995] und mit verminderter Fettsäure-Aufnahme der Kardiomyozyten in Verbindung gebracht [Tanaka et al. 2001]. Ein solcher Zusammenhang konnte an FAT/CD36-[-/-]-Mäusen experimentell bestätigt werden [Coburn

et al. 2000]. Den Adipozyten dieser „knock-out“-Mäuse fehlte die hochaffine, sättigbare Komponente der Fettsäure-Aufnahme. Die Tiere zeigten einen übergewichtigen Phänotyp mit erhöhten Triglycerid- und Fettsäurespiegeln im Plasma [Abumrad et al. 1999].

1.6.2 FAT/CD36 und Lipoprotein-Stoffwechsel

Die Beteiligung von FAT/CD36 am Lipoprotein-Stoffwechsel wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren beschreiben, dass FAT/CD36 VLDL und LDL („(very) low density lipoproteins“) bindet [Endemann et al. 1993]. Der Nachweis wurde aber bislang nur an Zellen erbracht, die FAT/CD36 verstärkt exprimieren, und nicht in physiologischen Systemen oder an Modellen, in denen die Oxydation konsequent vermieden wird [Calvo et al. 1998]. Auch die Bindung von HDL an FAT/CD36 wurde beschrieben, konnte aber nicht in Zusammenhang mit der Aufnahme von Cholesterin oder anderen Lipiden gebracht werden [Connelly et al. 1999]. Man vermutet, dass die Bindung von Lipoproteinen durch FAT/CD36 den Fettsäure-Transport nach Hydrolyse des Triglycerid-Gerüsts („core“) erleichtern könnte [Abumrad et al. 1999].

1.7 Ekto-Phosphorylierung

1.7.1 Substrate und Funktion von Ekto-Proteinkinasen

Proteinkinasen katalysieren die Proteinphosphorylierung an den Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin und regulieren dadurch wichtige zelluläre Prozesse. Intrazelluläre Proteinphosphorylierung ist seit langem und in vielen Zelltypen bekannt. Die Existenz extrazellulärer Proteinkinase-Aktivität wurde zuerst von Kübler und Co-Autoren an HeLa-Zellen gezeigt [Kübler et al. 1982] und konnte in den letzten Jahren an verschiedenen Zellen nachgewiesen werden [Redegeld et al. 1999, Review]. Die „Ekto“-Proteinkinasen phosphorylieren sowohl im Extrazellularraum gelöste Substrate als auch membranständige Proteine an deren extrazellulären Domänen. Man kennt bereits mehrere lösliche Substrate der Ekto-Phosphorylierung, bei denen der Phosphorylierungszustand die Interaktion mit Rezeptoren beeinflussen könnte, beispielsweise den „basic Fibroblast growth factor“ (bFGF). Die Beteiligung einer Ekto-Proteinphosphorylierung an der Steuerung zellulärer Prozesse wurde unter anderem an Thrombozyten gezeigt, deren Aggregation durch die Ekto-Phosphorylierung membranständiger Proteine beeinflusst wird [Babinska et al. 1996].

Redegeld und Co-Autoren liefern eine Übersicht über die bisher identifizierten Substrate und Funktionen der Ekto-Proteinkinasen [Redegeld et al. 1999, Review]. Aufgrund ihrer

Lokalisation und Substratspezifität können Ekto-Proteinkinasen insbesondere Zell-Zell-Interaktionen, Signaltransduktion und die Affinität von Liganden zu Membranproteinen beeinflussen. Die Aufklärung der entsprechenden Mechanismen gilt als vielversprechend, weil extrazelluläre Ansatzpunkte für die pharmakologische Manipulation der Ekto-Proteinphosphorylierung gefunden werden könnten.

1.7.2 Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36

Hatmi und Co-Autoren zeigten eine Ekto-Proteinkinase A-Aktivität an der äusseren Zellmembran humaner Thrombozyten und identifizierten FAT/CD36 als das hauptsächliche Substrat dieser Phosphorylierung. Die Autoren diskutieren physiologische Bedingungen, unter denen die Ekto-Proteinphosphorylierung an humanen Thrombozyten *in vivo* stattfinden kann [Hatmi et al. 1996]. Für eine Ekto-Phosphorylierung werden extrazelluläres ATP und cAMP benötigt. Es ist bekannt, dass extrazelluläres ATP physiologische Prozesse beeinflusst. Extrazelluläres ATP ist Agonist purinerger P_2-Rezeptoren und kann durch seine Metabolite, zum Beispiel Adenosin, als Agonist an purinergen P_1-Rezeptoren wirken [Burnstock 1990, Review]. ATP ist Donor der γ-Phosphatgruppe für Phosphorylierungsreaktionen. Auch cAMP findet sich unter bestimmten Bedingungen in ausreichender Konzentration im Extrazellularraum, um für Ekto-Phosphorylierungsreaktionen zur Verfügung zu stehen [Bankir et al. 2002].

Für FAT/CD36 humaner Thrombozyten wurde die Threonin-Phosphorylierung an der Aminosäure-Position Thr-91 nachgewiesen [Asch et al. 1993]. Noch unklar ist, ob Thr-91 auch das Substrat der von Hatmi und Co-Autoren beschriebenen Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 ist [Hatmi et al. 1996]. Für das an Thr-91 phosphorylierte Protein wurde ein verändertes Bindungsverhalten zu Thrombospondin und Kollagen beschrieben. Bei Mutagenese von Thr-91 durch Alanin, wodurch die Phosphorylierung verhindert wird, war das veränderte Bindungsverhalten nicht zu beobachten [Asch et al. 1993]. Die Bindung der Liganden Thrombospondin und Kollagen an FAT/CD36 beeinflusst die Thrombozyten-Aggregation. Das Beispiel macht deutlich, dass wichtige Funktionen des Proteins durch Phosphorylierung reguliert werden könnten. Der Nachweis der Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 und die gesicherte Beteiligung des Proteins am Transmembran-Transport langkettiger Fettsäuren boten einen Ansatzpunkt, die Bedeutung der Ekto-Proteinphosphorylierung für die zelluläre Fettsäure-Aufnahme zu untersuchen.

2 Fragestellung

Das Membranprotein FAT/CD36 ist an der zellulären Aufnahme exogener, langkettiger Fettsäuren beteiligt. An humanen Thrombozyten wurde die Proteinkinase A-vermittelte Ekto-Phosphorylierung des Proteins beschrieben [Hatmi et al. 1996]. Wir nahmen an, dass die Ektophosphorylierung von FAT/CD36 an der Regulation des Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren beteiligt sein könnte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen der Ektophosphorylierung von FAT/CD36 und der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten zu untersuchen.

Für die Untersuchungen musste die Isolation „ruhender“, humaner Thrombozyten („resting platelets“) etabliert werden. Dabei waren vorhandene Protokolle [Mustard et al. 1989, Baenziger und Majerus 1974] für unsere experimentellen Erfordernisse zu optimieren. Insbesondere musste eine geeignete Aggregationshemmung gefunden werden, weil die übliche Verwendung von Apyrase (ATP-Diphosphohydrolase) die ATP-abhängigen Schritte unserer Experimente verfälscht hätte.

Eine Methode zur Messung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten war zu etablieren.

An unserem Modell mussten die kinetischen Merkmale des erleichterten Transmembran-Transports langkettiger Fettsäuren gezeigt werden. Der Anteil der sättigbaren Komponente an der gesamten, initialen Palmitinsäure-Aufnahme war zu bestimmen, um mögliche Veränderungen dem proteinvermittelten Transport zuordnen zu können.

Die Proteinkinase A-vermittelte Ektophosphorylierung von FAT/CD36 [Hatmi et al. 1996] musste unter unseren experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden, und ein Zusammenhang mit der Aufnahme exogener, langkettiger Fettsäuren gezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

[9,10(n)^{3}H]-Palmitinsäure (52 Ci/mmol, 1 mCi/ml in Ethanol), Amersham Biosciences, Freiburg

γ-[^{32}P]-ATP (6 kCi/mmol, 10 mCi/ml, in Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), Hartmann Analytic, Braunschweig

Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (40 % (w/v)), Serva Electrophoresis, Heidelberg

Adenylyl-(β-γ-methylen)-triphosphat (β-γ-ATP), Sigma-Aldrich, Steinheim

Adenosin, Hemisulfatsalz, Sigma

ADP, Natriumsalz, Sigma

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm), Calbiochem, Bad Soden

Ammoniumperoxydisulfat, Sigma

AMP, Natriumsalz, Sigma

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

ATP, Magnesiumsalz, Sigma

β-Mercaptoethanol, Sigma

Bromphenolblau, Sigma

cAMP, Natriumsalz, Sigma

Celite™, Supelco, Bellefonte, PA, USA

Chemoluminiszenz Blotting Substrat (POD), Roche Diagnostics, Mannheim

Chloroform, Mallinckrodt Baker, Devenler, Niederlande

Chromatographie-Papier 3MM, Whatman International, Maidstone, England

D-(+)-Glukose, Sigma

Glycerin, Sigma

Glycin, Merck, Darmstadt

Heparin, Liquemin™ N 25000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen

Kieselgel 60-Platten für Dünnschicht-Chromatografie, Merck

Kollagen, Mascia Brunelli Progen, Mailand, Italien

Milchpulver „Glücksklee“, Nestlé, Frankfurt am Main

N-Glykosidase F, Calbiochem

NaCl 0,9 %, Braun, Melsungen

Natriumlaurylsulfat (SDS), Sigma

Nitrozellulose-Transfermembran, Schleicher und Schuell, Dassel

Palmitinsäure (1 mg/ml, in Ethanol), Ferak, Berlin

para-Nitrophenylphosphat (pNPP), Dinatrium-Hexahydrat, Calbiochem

Pierce SuperSignal Chemoluminiszenz-Substrat, Perbio Science, Bonn

Ponceau S, Sigma

Prostaglandin I_2 (in Glycinpuffer) Flolan™, Glaxo Wellcome, Oxford, England

Protease-Inhibitions-Cocktail-Tabletten „PIC Mini“, EDTA-frei, Roche Diagnostics

Protein-Kinase-Inhibitor-Peptid (PKI *5-24*), Sigma

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

Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V, Biomol Feinchemikalien, Hamburg

Rinderserumalbumin Fraktion V, fettsäurefrei, Boehringer Mannheim

Standard-Proteinmischung „High Molecular Weight“, Sigma

Szintillationsflüssigkeit OptiPhase HI-Safe 3, Wallac, Loughborough, England

TEMED (N,N,N`,N`-Tetramethyläthylenamin), Serva

Tris-Hydromethylaminomethan (Tris-Base), Sigma

Triton X-100, Bio-Rad, Richmond, CA, USA

Tween™ 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), Sigma

Die hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

3.2 Methoden

Die im Text erwähnten Puffer- und sonstigen Lösungen sind in Kapitel 3.3 zusammengestellt.

3.2.1 Isolierung humaner Thrombozyten

Humane Thrombozyten wurden aus dem Armvenenblut gesunder Probanden beiderlei Geschlechts gewonnen, die in den vorausgegangenen 14 Tagen keine Medikation erhalten hatten. Wir isolierten die Thrombozyten nach einer Standardmethode [Mustard et al. 1989], die durch die Verwendung von PGI_2 (Prostaglandin I_2) anstatt Apyrase (ATP-Diphosphohydrolase) zur Aggregationshemmung modifiziert wurde.

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

---

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

3.2.2 Aggregometrische Kontrolle der isolierten Thrombozyten

Mittels aggregometrischer Kontrolle wurde die Qualität der Präparation ruhender Thrombozyten überprüft. Zunächst wurde am Aggregometer (Whole Blood Aggregometer Typ 560-CA, Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA) ein Referenzwert für die Extinktion E_1 plättchenarmen Plasmas (PPP) bestimmt. Anschliessend wird normalerweise an einer Probe plättchenreichen Plasmas (PRP) die Extinktion E_2 gemessen. Der Differenzwert der Extinktionen $D = E_2 - E_1$ wird als Skala von 0 % bis 100 % dargestellt mit $E_2 = 0$ %. Ein Schreiber stellt die Extinktion der PRP-Probe mit einem Vorlauf von 25 mm/min fortlaufend grafisch dar. Die Plättchenaggregation im PRP wird stimuliert durch Zugabe von Kollagen (4 µg/ml) oder ADP (5 µM), und der zeitliche Verlauf der Aggregation wird über die Änderung der Extinktion dargestellt. Da in unserem Puffer die Plasma-Gerinnungsfaktoren fehlten, versetzten wir die zu überprüfende Thrombozytensuspension mit einem Aliquot PPP (je 250 µl) und setzten diese Mischung an Stelle des PRP. Im Gesamtvolumen von 500 µl wurden 0,5 x 10^6 Thrombozyten innerhalb von 2 h nach ihrer Isolation aggregometrisch überprüft.

3.2.3 Messung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Bei der neu zu etablierenden Methode zur Messung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten sollte die Aufnahmereaktion nach kurzen Inkubationszeiten beendet werden. Die Zellen mussten anschliessend schnell und vollständig vom fettsäurehaltigen Medium getrennt werden können.

Die Inkubation mit [^{3}H]-markierter Palmitinsäure wurde durch Zugabe eiskalter Stop-Lösung beendet. Zur anschliessenden Trennung von Medium und Zellen waren entweder die Abzentrifugation der Thrombozyten oder eine Filtration durchführbar. Wir entschieden uns für die Filtration. Die Filtration durch einen geeigneten Filter erlaubt die Trennung von Zellen und Inkubationsmedium sehr viel schneller als die Zentrifugation, bei der mehr und zeitintensivere Arbeitsschritte auszuführen sind. Die Trennung durch Zentrifugation hätte mindestens einen weiteren Resuspensions- und Transferschritt mit den damit verbundenen Ungenauigkeiten erfordert. Zudem erwies es sich als sehr vorteilhaft, die Fettsäure-Aufnahme der Zellen direkt nach der Trennung vom Medium im Szintillations-Zähler bestimmen zu können, ohne die Zellen vom Filter ablösen zu müssen. Die Verfahrensweise erwies sich als geeignet, die initiale Fettsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten reproduzierbar zu bestimmen.

3.2.3.1 Herstellung der [^{3}H]Palmitinsäurelösungen

Für die Herstellung der [^{3}H]-markierten Palmitinsäurelösungen wurden 11,2 µl Palmitinsäure (1 mg/ml) mit 2,8 µl [^{3}H]Palmitinsäure (1 mCi/ml, beide in Ethanol-Lösung) auf eine Spatelspitze Celite™ gegeben und unter Stickstoff getrocknet. Der getrockneten Mischung wurden 900 µl Tyrode-Puffer und 100 µl fettsäurefreies Rinderserum-Albumin (BSA, 30 mg/ml) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Mit Tyrode-Puffer wurde auf 10 ml aufgefüllt. Zur Entfernung des Celite™ wurde die Lösung zweifach zentrifugiert (1000 x g, 5 min) und abschliessend durch einen 0,2 µm-Filter gefiltert. Die hier angegebenen Mengen ergeben eine Lösung mit 5,1 nM freier Palmitinsäure, berechnet nach Richieri [Richieri et al. 1993]. Durch Änderung des Verhältnisses von Palmitinsäure zu BSA (PA:BSA = 0,4 bis 5,0) wurden Lösungen von 2,1 nM bis 97,7 nM freier Palmitinsäure hergestellt.

3.2.3.2 Durchführung der Experimente zur Bestimmung der Palmitinsäure-Aufnahme

Ansätze mit 0,5 x 10^8 Thrombozyten in 200 µl Tyrode-Puffer standen in 10 ml-Reaktionsgefässen bei 37 °C (Wasserbad) bereit. Durch regelmässiges Aufschütteln wurde das Sedimentieren der Zellen verhindert. Den Thrombozyten wurden die Substanzen (in Tyrode-Puffer) zugegeben, deren Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme gemessen werden sollte. Jeder Ansatz wurde mit Tyrode-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt. Ein Beispiel für eine solche Inkubation mit Angabe der Inkubationszeiten wird in Kap. 3.2.3.5 beschrieben. Dem Ansatz wurde 300 µl [^{3}H]Palmitinsäure-Lösung zugesetzt, die durch leichtes Schütteln unter die Thrombozyten gemischt wurde. Nach 20 s Inkubation wurde 2,5 ml eiskalte Stop-Lösung (BSA 1 % in NaCl 0,9 % (w/v)) zugegeben und das gesamte Volumen unverzüglich durch einen Polycarbonatfilter (Cyclopore™ Track Etched Membrane, Porengrösse 1 µm, Whatman International, Maidstone, England) gefiltert. Reaktionsgefäß und Apparatur wurden mit insgesamt 7,5 ml Stop-Lösung nachgespült. Der Filter wurde in ein Zählröhrchen überführt und 4 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Nach 1 h Standzeit wurde gründlich gemischt und die [^{3}H]-Messung im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (Liquid Scintillation Counter 1410, Perkin Elmer Wallac, Freiburg) vorgenommen.

3.2.3.3 Berechnung der Palmitinsäure-Aufnahme

Die Palmitinsäure-Aufnahme wurde nach folgender Formel berechnet:

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

U	= Palmitinsäure-Aufnahme	(pmol / 10^8 Thrombozyten)
D	= Zählrate der Probe	(dpm)
D_0	= Zählrate des Leerwerts	(dpm)
v	= spezifische Aktivität der	[^{3}H] Palmitinsäurelösung (dpm / pmol)
f	= Normierungsfaktor	(10^8 Zellen / Zellzahl in der Probe)

3.2.3.4 Bestimmung von Leerwert und Kontrollwert

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

In jedem Experiment wurden zur Bestimmung eines Kontrollwerts Thrombozyten nach der Isolation ohne weitere Zusätze in Tyrode-Puffer mit [^{3}H]Palmitinsäure inkubiert. Ihre Palmitinsäure-Aufnahme wurde für die jeweilige Thrombozyten-Präparation als „100 %“ definiert. Die Effekte verschiedener Inkubationsbedingungen auf die Palmitinsäure-Aufnahme wurden in Relation zum Kontrollwert als „x % der Kontrolle“ ausgedrückt.

3.2.3.5 Palmitinsäure-Aufnahme bei Ekto-Proteinphosphorylierung, Kontrollexperimente

Die Thrombozyten wurden vor der Messung der Palmitinsäure-Aufnahme den Inkubationsbedingungen zur Ektophosphorylierung von FAT/CD36 ausgesetzt, wie sie Hatmi und Co-Autoren beschreiben [Hatmi et al. 1996], um den Zusammenhang der Ekto-Proteinphosphorylierung mit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme zu bestimmen.

Dazu wurde 0,5 x 10^8 Thrombozyten in 280 µl Tyrode-Puffer 5 µM cAMP zugesetzt und 5 min bei 37 °C präinkubiert. Anschliessend wurde 1 fM bis 50 µM ATP zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes war 300 µl. Die Palmitinsäure-Aufnahme wurde wie oben beschrieben bestimmt (Kap. 3.2.3.2).

Zusätzlich wurde unter verschiedenen Kontrollbedingungen inkubiert. Die Substanzen der Kontrollexperimente wurden entweder anstatt ATP (β-γ-ATP) oder zeitgleich mit ATP (PKI *5-24*, Alkalische Phosphatase) zugegeben. Zur Überprüfung der Reversibilität des Phosphorylierungseffekts wurde zunächst 10 min mit cAMP und ATP inkubiert, und anschliessend ein Aliquot aus demselben Ansatz weitere 20 min mit Alkalischer Phosphatase inkubiert.

3.2.4 Bestimmung des Veresterungsgrads der aufgenommenen Palmitinsäure

Nach 20 s [^{3}H]Palmitinsäure-Aufnahme (Kap. 3.2.3.2) wurden 0,8 x 10^9 Thrombozyten in 500 µl SDS (0,5 M) lysiert. Nach Extraktion der Lipide [Bligh und Dyer 1959] wurde die Probe bei 40 °C unter Stickstoff getrocknet. Die Lipidklassen wurden mittels Dünnschicht-Chromatografie getrennt (Laufmittel Hexan:Ether:Essigsäure 80:20:2 (v/v)) [Rüstow und Kunze 1984]. Anhand ihrer chromatografischen Mobilität (relativ zu Standardlipiden) wurden Phospholipide, Diglyceride, Triglyceride und freie Fettsäuren identifiziert und von der Kieselgelplatte in Zählröhrchen überführt. Nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität im Flüssig-Szintillations-Spektrometer gemessen. Der Veresterungsgrad der [^{3}H]Palmitinsäure in den Glycerolipiden wurde für die einzelnen Fraktionen berechnet.

3.2.5 Autoradiografischer Nachweis der Ekto-Proteinphosphorylierung

Die cAMP-abhängige Ekto-Phosphorylierung der thrombozytären Proteine wurde mit γ-[^{32}P]-ATP autoradiografisch nachgewiesen.

Je 5 x 10^8 Thrombozyten in 500 µl Tyrode-Puffer standen in zwei parallelen Ansätzen bei 37 °C bereit. Einer Probe wurde cAMP (5 µM extrazelluläre Konzentration) zugegeben und 5 min präinkubiert. Anschliessend wurde beiden Proben 35 µCi γ-[^{32}P]-ATP (15 nM) zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Durch Zugabe von 900 µl eiskalter Stop-Lösung (10 mM pNPP in Tyrode-Puffer) wurde die Reaktion beendet und unverzüglich zentrifugiert (5000 x g, 2 min). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 20 µl doppelt konzentriertem Laemmli-Probenpuffer gründlich gemischt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proteine wurden durch Gel-Elektrophorese getrennt und im Semidry-Blotting-Verfahren auf Nitrozellulosefolie übertragen. Der Blot wurde auf einen Film (Kodak BioMax-MR-1 in Kodak X-Omatic Cassette) gelegt, der nach 4-8 Tagen Belichtungszeit (-20 °C) entwickelt wurde. Der Blot wurde anschliessend für den FAT/CD36-Immunoblot verwendet.

3.2.6 Präparation von Thrombozytenmembranen

Thrombozytenmembranen wurden präpariert, um Sicherheit zu erlangen, dass es sich beim Substrat der autoradiografisch nachgewiesenen Proteinphosphorylierung um ein membranständiges Protein handelt. Dazu wurden 5 x 10^8 Thrombozyten in Tyrode-Puffer 1 h mit 1 % (v/v) Triton X-100 auf Eis lysiert. Anschliessend wurde zentrifugiert (20000 x g, 30 min, 4 °C) und das Sediment in 500 µl Tyrode-Puffer resuspendiert. Der autoradiografische Nachweis der Ekto-Proteinphosphorylierung wurde mit den Thrombozytenmembranen nach dem in Kap. 3.2.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

3.2.7 Deglykosylierung der thrombozytären Proteine

Für eine zusätzliche Nachweismöglichkeit der Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 wurde das Gesamtprotein von 7 x 10^8 Thrombozyten im Anschluss an die Ekto-Proteinphosphorylierung (Kap. 3.2.5) deglykosyliert. Nach Lyse der Zellen in 0,1 % SDS (w/v) wurde das zelluläre Protein mit 50 mM β-Mercaptoethanol und durch Erhitzen auf 95 °C (5 min) denaturiert. Nach Zugabe von Triton X-100 (5 % v/v) und N-Glykosidase F (50 U) wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Das deglykosylierte Gesamtprotein wurde durch Gel-Elektrophorese getrennt und die Autoradiografie wie beschrieben durchgeführt (Kap. 3.2.5).

3.2.8 Gel-Elektrophorese und Blotting

Für die autoradiografische Darstellung der Proteinphosphorylierung und den immunologischen Nachweis von FAT/CD36 wurden die thrombozytären Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli getrennt [Laemmli 1970] (Elektrophorese-Apparatur Phero-vert 180, Biotec Fischer, Reiskirchen) und anschliessend durch „Semidry-Blotting“ [Kyhse-Andersen 1984] (Semi-Dry-Blotter Pegasus, Phase GmbH, Lübeck) auf Nitrozellulosefolie übertragen.

Die Proteinlösungen wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und auf ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel (Sammelgel 4,5 %, Trenngel 8 % (w/v)) transferiert. Bei 55 mA (max. 250 V) wurden die Proteine 1,5 h elektrophoretisch getrennt und anschliessend durch Semidry-Transfer 1 h bei 2,5 mA/cm^2 auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Nach reversibler Anfärbung der Proteine mit Ponceau S wurden die Banden der Standard-Proteinlösung zur späteren Massenbestimmung markiert.

3.2.9 FAT/CD36-Immunoblotting

FAT/CD36 wurde mit den spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörpern Mo25* und H-300 (Santa Cruz, Heidelberg) immunologisch identifiziert.

Dazu wurden die Nitrozellulose-Blots in unspezifischer Blockier-Lösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (5, 20 und 30 min) in TBS-t (Tween™ 20 0,1 % (v/v) in Tris-buffered saline, pH 7,4) wurden die Blots für 2 h bei 30 °C mit dem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper inkubiert, der in der Blockier-Lösung 1:500 (H-300) beziehungsweise 1:5000 (Mo25) verdünnt war. Die Blots wurden erneut dreimal gewaschen und mit an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Anti-Maus/Kaninchen-IgG für 2 h bei 30 °C inkubiert. Der Antikörper war (für alle Blots) 1:1500 in Blockier-Lösung A verdünnt. Die immunreaktiven Banden wurden mit dem „Pierce SuperSignal Chemoluminescent Substrate“ sichtbar gemacht.

---

* Der Antikörper Mo25 wurde freundlich zur Verfügung gestellt durch N. Tandon, Thrombosis Research Laboratory, Otsuka Maryland Research Institute, Rockville, MD, USA.

3.2.10 Einsatz von Radiochemikalien

Das Lipidlabor der Klinik für Neonatologie am Campus Charité Mitte verfügt über die Erlaubnis des Landesamts für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin zur Arbeit mit Radiochemikalien (Genehmigungsbescheid U 1367/92 vom 30.7.1992). Die genehmigte Bezugsaktivität beträgt jährlich 400 MBq (10,8 mCi) [^{32}P] und 1000 MBq (27 mCi) [^{3}H]. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden insgesamt 1,1 mCi [^{32}P] und 1 mCi [^{3}H] eingesetzt.

3.2.11 Statistik

Bei den angegebenen Messwerten handelt es sich um den Mittelwert von Dreifachbestimmungen aus einer Thrombozytenpräparation. Sofern nicht anders ausgewiesen, wurden die Ergebnisse in drei unabhängigen Experimenten reproduziert ($n = 3$). Es wird der Mittelwert (Mw.) ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaartem, zweiseitigem Students-t-Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0{,}05$. Für die Grafiken und statistischen Berechnungen wurden die Programme GraphPad Prism (Version 3.00, GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.) und Microsoft Excel 97 (Microsoft, Redmond, WA, U.S.A.) verwendet.

3.3 Verwendete Puffer und Lösungen

Isolierung humaner Thrombozyten

Antikoagulans Acid-Citrat-Dextrose (ACD):

Na_3H_2 - Citrat	27,4 g/l	7 mM
Citrat • H_2O	14,8 g/l	93 mM
Glukose	25 g/l	139 mM
Heparin	20 U/ml	
in aqua dest., pH 4,5		

Tyrode-Waschpuffer:

NaCl	8 g/l	137 mM
KCl	0,2 g/l	2,7 mM
$NaHCO_3$	1 g/l	11,9 mM
NaH_2PO_4	0,05 g/l	0,3 mM
$MgCl_2$ • 6 H_2O	0,203 g/l	1 mM
$CaCl_2$ • 6 H_2O	0,438 g/l	2 mM
Glukose	1 g/l	5,6 mM
BSA (fettsäurefrei)	3,5 g/l	0,35 % (w/v)
Prostaglandin I_2 (PGI_2)		1 nM
in aqua dest., pH 7,35		

Tyrode-Resuspensionspuffer:

Entspricht dem Tyrode-Waschpuffer, aber ohne PGI_2 und ohne BSA. Auf das „Schutzprotein" BSA wurde verzichtet, da es die Messung der Fettsäure-Aufnahme beeinflusst hätte. Der Tyrode-Resuspensionspuffer wird im Text auch vereinfachend als Tyrode-Puffer bezeichnet.

Messung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme

Die Reagenzien cAMP, ATP, β-γ-ATP, Alkalische Phospatase und PKI *5-24* wurden in Tyrode-Puffer gelöst und unmittelbar vor Versuchsbeginn von der Stammlösung auf die benötigte Konzentration verdünnt.

Gel-Elektrophorese und Blotting

Sammel- und Trenngel:

Stammlösungen:	(A)	Acrylamid/Bisacrylamid	30 % / 0,8 % (w/v)
	(B)	Tris/HCl-Puffer (Sammelgel)	0,5 M , pH 6,8
	(C)	Tris/HCl-Puffer (Trenngel)	1,5 M , pH 8,8
	(D)	SDS	10 % (w/v)
	(E)	TEMED	
	(F)	Ammoniumperoxidsulfat	10 % (w/v)

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

8 % Trenngel:	(A)	6000 µl	
	(C)	7500 µl	
	(D)	300 µl	
	(E)	20 µl	
	(F)	300 µl	ad 30 ml aqua dest.

Elektrophoresepuffer:

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)

in aqua dest.

unspezifische Blockier-Lösungen für FAT/CD36-Immunoblotting:

A: für Mo25	Blotting Substrat (POD)	1 % (v/v)
B: für H-300	Milchpulver	5 % (w/v)
in TBS-t:	Tween™ 20	0,1 % (v/v)
	in „Tris-buffered saline“, pH 7,4	

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung humaner Thrombozyten

Wir isolierten ruhende Thrombozyten nach einem von Mustard beschriebenen [Mustard et al. 1989], leicht modifizierten Protokoll (Methoden, Kap. 3.2.1). Die Tabelle 1 stellt typische Ergebnisse unserer Thrombozytenpräparationen aus 31 ml Vollblut dar.

Tab. 1 Thrombozytenpräparationen

Präparation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	**Mw.**
Spender	F.G.	B.B.	P.M.	F.G.	P.M.	F.G.	F.G.	R.J.	M.N.	B.C.	B.C.	R.J.	
Ausbeute (x 10^8 Thr.)	35,9	32,2	38,1	34,2	39,2	33	31,6	40,2	36,8	38,8	36,5	34,3	**35,9**
Ausbeute (%)	72	56	70	72	74	65	58	76	75	75	68	60	**68,4**
Leukozyten (‰)	0,45	0,28	0,2	0,31	0,33	0,38	0,35	0,3	0,41	0,32	0,27	0,32	**0,33**
Erythrozyten (‰)	< 10	10,1	< 10	< 10	13,9	< 10	15,4	< 10	< 10	14,5	< 10	< 10	

Ausbeute (x 10^8 Thr.) entspricht der absoluten Thrombozytenzahl, die aus 31 ml Vollblut isoliert wurde. Ausbeute (%) zeigt an, welcher prozentuale Anteil der in 31 ml Spenderblut insgesamt enthaltenen Thrombozyten isoliert werden konnte. Die Verunreinigung der Präparationen mit Leukozyten und Erythrozyten (‰) wurde auf die Thrombozytenzahl in der Suspension bezogen. Mw. = Mittelwert.

Es zeigen sich die Reproduzierbarkeit unserer Präparationen und eine sehr geringe Verunreinigung mit anderen Zelltypen. Die von Baenziger [Baenziger und Majerus 1974] und Franke* beschriebenen Methoden zur Isolation ruhender Thrombozyten erwiesen sich als ungeeignet, weil es häufig schon während oder kurz nach der Präparation zur Verklumpung der Zellen kam.

---

* persönliche Mitteilung Dr. Leonora Franke, Universitätsklinikum Charité, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, AG Neurobiologie, Campus Charité Mitte, Berlin

Aggregometrische Kontrolle der isolierten Thrombozyten

Durch die Messung des Aggregationsverhaltens nach Stimulation mit Kollagen oder ADP kann die funktionelle Integrität der isolierten Zellen kontrolliert werden. Nach Zugabe von Kollagen aggregierten die isolierten Thrombozyten bis zu 83 % (70 % ± 13,5). Unsere Präparationen erreichten damit den Normbereich für plättchenreiches Plasma (PRP) von 70-100 %. Auch die mittlere Latenzzeit zwischen der Zugabe des Kollagens und dem Einsetzen der Aggregation war mit 45 s normal. Die Aggregation nach Stimulation durch ADP lag mit maximal 10 % (7,5 % ± 3,5) deutlich unterhalb des Normbereichs für PRP von 70-100 %. Es bestätigte sich, dass wir „ruhende“, also nicht aktivierte Thrombozyten isolierten. Die Zellen reagierten auf Kollagen-Stimulation voll funktionsfähig, waren allerdings teilweise refraktär auf ADP-Stimulation.

4.2 Messung der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Ein zur Messung der Serotonin- (5HT-) Aufnahme humaner Thrombozyten entwickelter Versuchsaufbau* wurde entsprechend den speziellen Anforderungen bei der Arbeit mit Fettsäuren modifiziert. Freie Fettsäuren und das Trägerprotein Rinderserum-Albumin (BSA) müssen den Filter ungehindert passieren, die Thrombozyten hingegen sollen vollständig zurückgehalten werden. Verschiedene Filtermaterialien wurden auf ihre Eignung überprüft (Tabelle 2).

Tab. 2 Eignung verschiedener Filtertypen

Filtermaterial **Porengrösse (µm)**	Polycarbonat **1**	Polycarbonat **5**	Glasfaser **1,2**	Polypropylen **2,5**	Nitrozellulose **3**
Leerwert	0,3	0,4	6,1	1,2	2,5
Aufnahme (5 s)	7,5	0,5	15,5	2,2	3,2
Aufnahme (60 s)	38,0	0,7	74,6	n.b.	n.b.

Palmitinsäure-Aufnahme (pmol) bei 41,4 nM extrazellulärer Konzentration freier Palmitinsäure nach 5 s bzw. 60 s Inkubation mit 0,5 x 10^8 Thrombozyten bei 37 ºC. Der Leerwert (pmol) misst die Adhäsion von Palmitinsäure an der Filtermembran bei Filtration ohne Thrombozyten. Filtermaterialien: Polycarbonat = Whatman Cyclopore™ Track Etched Membrane, Glasfaser = Whatman GF/C, Polypropylen = Millipore Polypropylene, Nitrozellulose = Millipore Nitrocellulose MF. n.b. = nicht bestimmt

Die Adhäsion von [^{3}H]-markierter Palmitinsäure an der Filtermembran bei Filtration ohne Thrombozyten wird als Leerwert erfasst. Er ist idealerweise Null, wenn die Fettsäure den Filter vollständig passiert. Der Leerwert ist als systematischer Fehler von jedem Einzelwert der Aufnahmemessungen abzuziehen. Ein Aufnahmewert ergibt sich, wenn die Thrombozyten nach der Inkubation mit [^{3}H]-markierter Palmitinsäure-Lösung filtriert werden. Dabei ist zu erwarten, dass der Aufnahmewert in Abhängigkeit von der Inkubationszeit grösser wird.

---

* persönliche Mitteilung Dr. Leonora Franke, Universitätsklinikum Charité, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, AG Neurobiologie, Campus Charité Mitte, Berlin

Nur vom Polycarbonatfilter mit der Porengrösse 1 µm wurden alle aufgeführten Anforderungen erfüllt. Wir wählten diesen Filter für unsere Versuche aus. Die Porengrösse von 1 µm ist gut geeignet für die vollständige Rückhaltung der Thrombozyten (Durchmesser 1,2 - 4,0 µm). Beim gleichen Filtermaterial lag bei einer Porengrösse von 5 µm im Aufnahmeversuch praktisch keine Abweichung vom Leerwert vor. Zum einen bestätigt das die Eignung des Polycarbonats, da weder Zellen noch Fettsäure adhärieren. Zum anderen zeigt es, dass sich unter unseren Bedingungen keine Thrombozyten-Aggregate ausbilden, welche sonst vermutlich am Filter adhärieren würden. Der Glasfaserfilter ist aufgrund hoher Leerwerte ungeeignet, die auf Adhäsion der Palmitinsäure-Albumin-Lösung zurückzuführen sind. Hohe Leerwerte und zugleich geringes Zurückhalten der Thrombozyten zeigten sich bei den Filtermaterialien Polypropylen und Nitrozellulose.

4.3 Kinetik der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Um geeignete Standardbedingungen für unsere Versuche zu bestimmen, charakterisierten wir zunächst die Palmitinsäure-Aufnahmekinetik humaner Thrombozyten.

4.3.1 Zeitabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Zur Überprüfung der Zeitabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme wurden ruhende Thrombozyten für 5 s bis 180 s mit [^{3}H]-markierter Palmitinsäure inkubiert, die Konzentration an freier Fettsäure betrug konstant 5,1 nM. Abbildung 2 stellt die Ergebnisse dar.

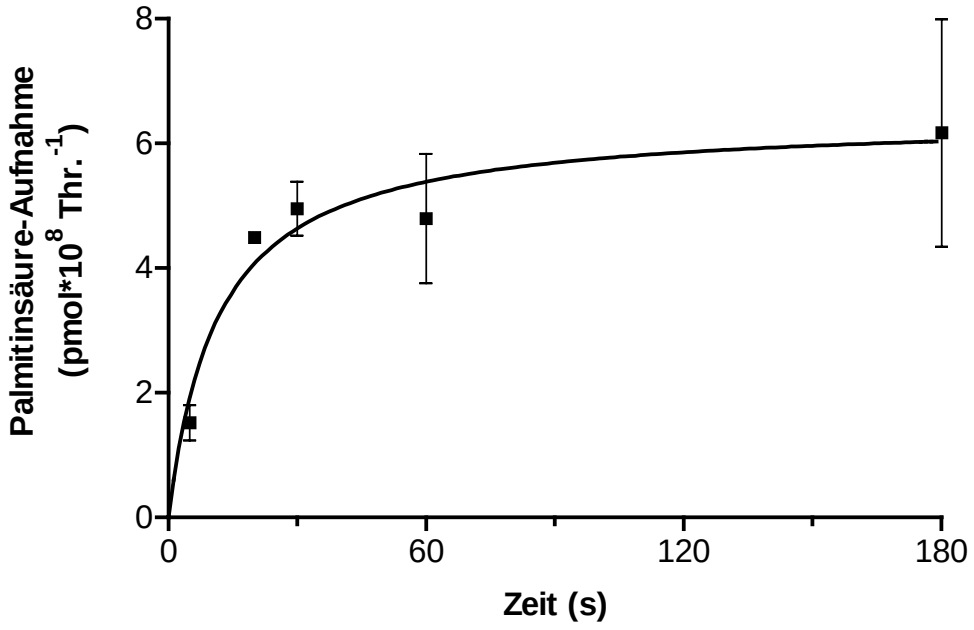


Abb. 2 Zeitabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Palmitinsäure-Aufnahme (pmol x 10^8 Thr.$^{-1}$) bei 5,1 nM extrazellulärer Konzentration freier Palmitinsäure, n = 2, ± SD.

Es wurde eine Inkubationszeit von 20 s als Standardbedingung für die weiteren Experimente gewählt.

4.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Zur Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der Palmitinsäure-Aufnahme wurden ruhende Thrombozyten für 20 s mit [^{3}H]-markierter Palmitinsäure inkubiert, die Konzentration an freier Fettsäure war 5,1 nM bis 808 nM, berechnet nach Richieri und Co-Autoren [Richieri et al. 1993]. Es zeigte sich eine nicht-lineare, sättigbare Funktion (Abbildungen 3 und 4). Der Regressionskoeffizient ergab r = 0,97.

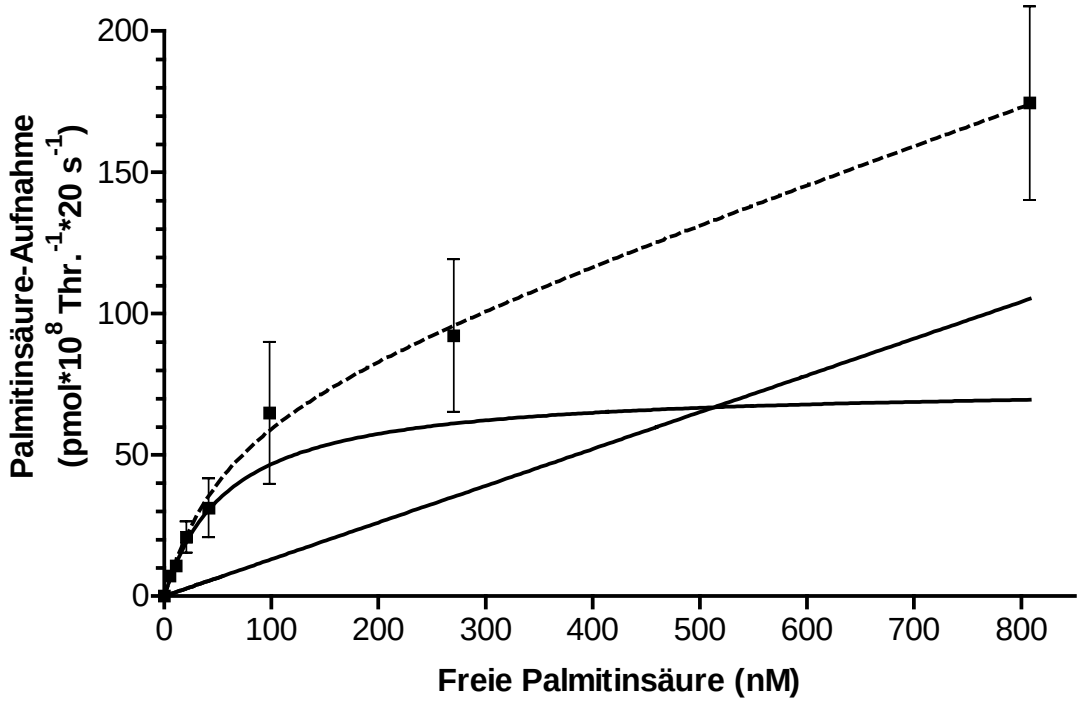


Abb. 3 Konzentrationsabhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Initiale Palmitinsäure-Aufnahme (pmol x 10^8 Thr.$^{-1}$ x 20 s^{-1}) in Abhängigkeit von der extrazellulären Konzentration freier Palmitinsäure (nM), n = 2 (11,1 nM: n = 1), ± SD. Die unterbrochene Kurve zeigt die nonlineare Regression berechnet nach der Formel: $y = [v_{max} \bullet x/(K_m + x)] + [zx + s]$ (GraphPad Prism 3.0). Die durchgezogenen Kurven stellen nur die sättigbare Komponente: $y = [v_{max} \bullet x/(K_m + x)]$ bzw. nur die lineare Komponente: $y = [zx + s]$ der Regressionskurve dar.

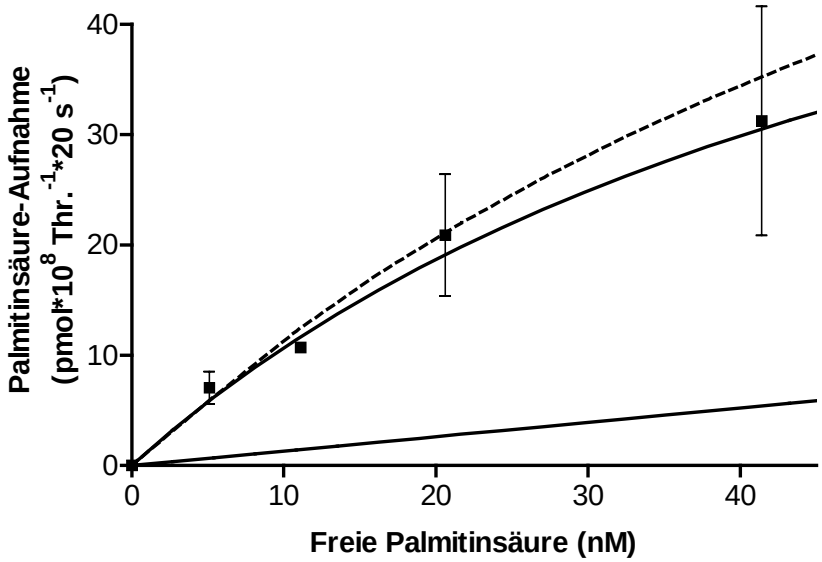


Abb. 4 Konzentrationsabhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Ausschnittsvergrößerung der Abbildung 3, extrazelluläre Konzentration freier Palmitinsäure bis 45 nM

Als Standardbedingung für die Messung der Palmitinsäure-Aufnahme wurde zunächst eine extrazelluläre Palmitinsäure-Konzentration von 20,6 nM gewählt, weil diese zur etwa halbmaximalen, experimentell bestimmten Aufnahme während 20 s führte. Die Abweichungen, welche wir im Rahmen der zu untersuchenden Regulation des Fettsäure-Transports erwarteten, sollten in diesem Bereich gut zu beobachten sein. Weitere Experimente zeigten allerdings eine wesentlich bessere Reproduzierbarkeit der absoluten Palmitinsäure-Aufnahme bei einer extrazellulären Konzentration von 5,1 nM. Bei dieser niedrigen, eher den physiologischen Bedingungen (7,5 ± 2,5 nM) entsprechenden Konzentration [Richieri und Kleinfeld 1995] war der Effekt der Regulation deutlich zu messen. Auf dieser Grundlage wurden für alle weiteren Experimente folgende Bedingungen festgelegt: 0,5 x 10^8 Thrombozyten werden für 20 s mit 5,1 nM freier Palmitinsäure bei 37 °C inkubiert.

Bestimmung des Veresterungsgrads der aufgenommenen Palmitinsäure

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Palmitinsäure-Aufnahme durch den Einbau der Fettsäuren in Glycerolipide beeinflusst wird. Wir bestimmten die Veresterung der unter Standardbedingungen aufgenommenen [^{3}H]Palmitinsäure zu 20,3 ± 7,6 % (Tabelle 3).

Tab. 3 Veresterungsgrad der aufgenommenen [^{3}H]Palmitinsäure

Experiment Nr.	1	2	3	**Mittelwert**
Phospholipide	10%	11%	25%	15,3%
Diglyceride	4%	4%	3%	3,7%
Triglyceride	1%	2%	1%	1,3%
Gesamt	**15%**	**17%**	**29%**	**20,3%**

Anteil (%) der zu Phospholipiden, Di- und Triglyceriden veresterten [^{3}H]Palmitinsäure an der insgesamt während 20 s Inkubation aufgenommenen [^{3}H]Palmitinsäure.

4.4 Untersuchungen zur Regulation der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Übersicht

Abbildung 5 zeigt eine grafische Übersicht der Ergebnisse unserer Experimente zur Regulation der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten.

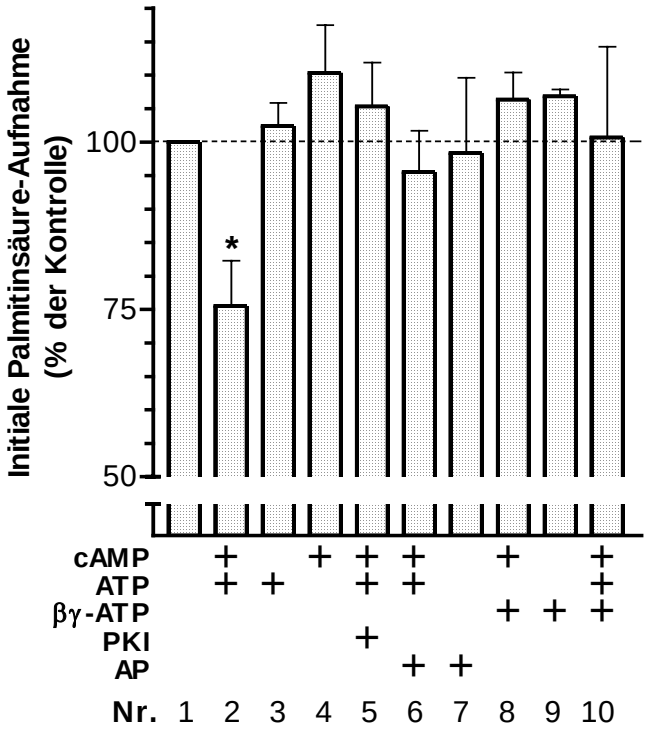


Abb. 5 Experimente zur initialen Palmitinsäure-Aufnahme

Die Abbildung 5 zeigt die initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten unter verschiedenen Inkubationsbedingungen (% des Kontrollwerts, +SD, n = 3-4, *: $p \leq 0{,}05$). Der Kontrollwert entspricht der Palmitinsäure-Aufnahme ruhender Thrombozyten in Tyrode-Medium und wurde als 100 % definiert (Balken 1). Die Markierungen (+) zeigen die Substanzen an, die dem Tyrode-Medium bei der jeweiligen Inkubation zugefügt wurden (Balken 2-10). Extrazelluläre Konzentrationen: [cAMP] = 5 µM, [ATP] = 1 nM, [β,γ- ATP] = 1 nM (Säulen 8 und 9), [β,γ- ATP] = 5 µM (Säule 10), [PKI] = 2,25 µM (Proteinkinase A-Inhibitorpeptid *5-24*), [AP] = 3 U/ml (Alkalische Phosphatase).

Unter den Bedingungen der Ektophosphorylierung von FAT/CD36 war die Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten signifikant auf 75 % des Kontrollwerts vermindert (bei Inkubation mit 5µM cAMP + 1 nM ATP, Abb. 5 Balken 2), im Einzelexperiment auf bis zu 58 % (nicht gezeigt). Der Effekt ist signifikant und reproduzierbar ($p < 0,05$). In den verschiedenen Kontrollexperimenten (Abb. 5 Balken 3-10) zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme. Die einzelnen Inkubationsbedingungen werden im folgenden besprochen.

4.4.1 Kontrollwert der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

In jeder Versuchsreihe musste ein Kontrollwert bestimmt werden (Kap. 3.2.3.4), um die Auswirkung unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme quantifizieren zu können. Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung typischer Kontrollwerte.

Tab. 4 Kontrollwerte der Palmitinsäure-Aufnahme

Präparation	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	**Mw.**	SD
Aufnahme	18,2	15,2	13,5	12,8	13,7	14,1	15,5	16,2	16,3	15,0	**15,1**	1,7

Palmitinsäure-Aufnahme isolierter, ruhender humaner Thrombozyten (in pmol x 10^8 Thr.$^{-1}$ x 20 s^{-1}) bei Inkubation mit 5,1 nM freier Palmitinsäure; Mw. = Mittelwert

Der aus diesen Werten kalkulierte Mittelwert ± SD war 15,1 ± 1,7 (n = 10). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Thrombozyten aus dem Blut verschiedener Spender isoliert wurden, zeigt das Ergebnis die gute Reproduzierbarkeit der Versuchsreihen.

4.4.2 Einfluss von extrazellulärem cAMP und ATP auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Die Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 humaner Thrombozyten wird nach Hatmi und Co-Autoren durch eine Ekto-Proteinkinase A bewirkt [Hatmi et al. 1996]. Für die Ekto-Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung werden extrazelluläres cAMP und ATP gebraucht. Der Einfluss der einzelnen Substanzen auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten wurde untersucht.

cAMP

Inkubation der Thrombozyten mit cAMP allein hatte keinen signifikanten Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme (Abb. 5 Balken 4). Unter den Bedingungen der Ekto-Protein-phosphorylierung, also bei gemeinsamer Inkubation mit ATP, war die Hemmung der Palmitinsäure-Aufnahme cAMP-abhängig (Abb. 5 Balken 2). cAMP wurde in allen Experimenten in einer extrazellulären Konzentration von 5 µM eingesetzt, wie in den Protokollen zur Analyse von Proteinkinase-Aktivität angegeben [Walaas und Ostvold 1997] und wie von Hatmi und Co-Autoren bei der Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 durchgeführt [Hatmi et al. 1996].

ATP

Extrazelluläres ATP ist bei der Proteinkinase A-vermittelten Ektophosphorylierung der Donor der Phosphat-Gruppe. Inkubation der Thrombozyten mit ATP allein hatte keinen signifikanten Effekt auf ihre Palmitinsäure-Aufnahme (Abb. 5 Balken 3). Unter den Bedingungen der Ekto-Proteinphosphorylierung wurde die Palmitinsäure-Aufnahme gehemmt (Abb. 5 Balken 2). Die Abhängigkeit der Hemmung von der extrazellulären ATP-Konzentration wird in Kap. 4.4.4 besprochen.

Adenylyl-[β,γ-Methylen]-triphosphat (β,γ-ATP)

β,γ-ATP ist ein ATP-Analogon mit einer Methylgruppe zwischen der β- und γ-Phosphat-Gruppe. Es kann nicht zu ADP und P_i hydrolysiert werden, das γ-Phosphat steht daher nicht für Phosphorylierungs-Reaktionen zur Verfügung. Inkubation der Thrombozyten mit β,γ-ATP allein hatte keinen signifikanten Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme (Abb. 5 Balken 9). Um zu überprüfen, ob die Hemmung bei Inkubation mit cAMP und ATP von der Abspaltbarkeit der γ-Phosphat-Gruppe des ATP abhängig ist, ersetzten wir ATP durch β,γ-ATP (1 nM). Der inhibitorische Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme blieb aus (Abb. 5 Balken 8).

In einem weiteren Experiment inkubierten wir die Thrombozyten gleichzeitig mit cAMP, einer geeigneten, extrazellulären ATP-Konzentration (1 nM) und einem Überschuss an β,γ-ATP (5 µM). Im Ansatz konkurrierte nun 1 nM hydolysierbares ATP mit einem Überschuss an schwer-hydolysierbarem ATP, es kam nicht zur Hemmung der Palmitinsäure-Aufnahme (Abb. 5 Balken 10).

ATP-Derivate

Bei der Inkubation mit ATP können Spuren der ATP-Derivate ADP, AMP und Adenosin vorhandensein. Um auszuschliessen, dass der inhibitorische Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme durch diese Derivate vermittelt wird, wurden Thrombozyten mit den einzelnen Substanzen inkubiert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zum Kontrollwert (ADP 5 µM: 95 %, AMP 5 µM: 95 %, Adenosin 5 µM: 97 %, n = 1).

4.4.3 Bestätigung der Abhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten von der Ekto-Phosphorylierung

Zur weiteren Absicherung der Abhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme von der Ekto-Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung wurde als „Gegenreaktion“ der Phosphorylierung der Einfluss der Dephosphorylierung durch Alkalische Phosphatase untersucht. In einem zusätzlichen Kontrollexperiment wurde das spezifische Proteinkinase A Inhibitor-Peptid PKI *5-24* eingesetzt.

Alkalische Phosphatase

Bei Inkubation der Thrombozyten unter Phosphorylierungsbedingungen mit cAMP (5 µM) und ATP (1 nM) und gleichzeitiger Anwesenheit von Alkalischer Phosphatase (3 U/ml) kam es nicht zum hemmenden Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme (Abb. 5 Balken 6). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt der Ektophosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme durch anschliessende Dephosphorylierung vollständig reversibel war (Kap. 4.4.5).

Proteinkinase A-Inhibitorpeptids *5-24* (PKI *5-24*)

Bei Inkubation der Thrombozyten unter Phosphorylierungsbedingungen mit cAMP (5 µM) und ATP (1 nM) in Anwesenheit des spezifischen, nicht zellgängigen PKI *5-24* (5 µg/ml) kam es nicht zum hemmenden Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme (Abb. 5 Balken 5).

4.4.4 Abhängigkeit der Hemmung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme von der extrazellulären ATP-Konzentration

Bei konstanter cAMP-Konzentration von 5 µM wählten wir die extrazelluläre ATP-Konzentration zunächst im Bereich zwischen 5 µM und 50 µM, wie in den Protokollen zur *in vitro*-Analyse von Proteinkinase-Aktivität angegeben [Walaas und Ostvold 1997]. Es zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme. Bei 5 µM extrazellulärer ATP-Konzentration wiesen die Ergebnisse auf eine Inhibition der Palmitinsäure-Aufnahme hin, waren aber nicht signifikant. Wir senkten die ATP-Konzentration daraufhin auf 15 nM, wie von Hatmi und Co-Autoren für die Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 beschrieben [Hatmi et al. 1996] und beobachteten eine signifikante Senkung der Palmitinsäure-Aufnahme. Der Effekt war bei ATP-Konzentrationen zwischen 10 pM und 15 nM signifikant (Abbildung 6). ATP-Konzentrationen unter 10 pM hatten keinen signifikanten Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme.

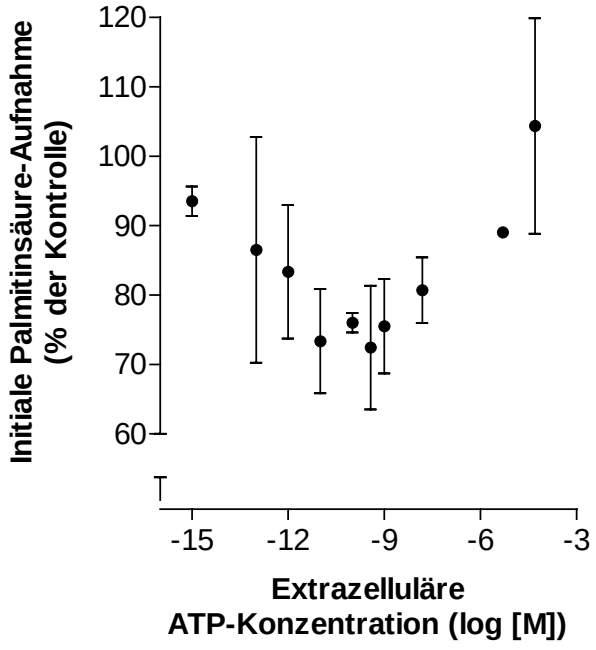


Abb. 6 Palmitinsäure-Aufnahme in Abhängigkeit von extrazellulärer ATP-Konzentration

Initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten (% des Kontrollwerts) in Abhängigkeit von der extrazellulären ATP-Konzentration, logarhythmische Darstellung, (n = 3, ausser: [ATP] = 5 µM und [ATP] = 0,1 pM: n = 2, [ATP] = 0,5 nM: n = 4). Extrazelluläres [cAMP] = 5 µM (konstant).

4.4.5 Reversibilität der phosphorylierungsabhängigen Hemmung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme durch Alkalische Phosphatase

Mittels Dephosphorylierung durch Alkalische Phosphatase untersuchten wir die Reversibilität der phosphorylierungsabhängigen Hemmung der Palmitinsäure-Aufnahme. Dazu wurden die Thrombozyten zunächst unter Phosphorylierungsbedingungen mit cAMP (5 µM) und ATP (1 nM) inkubiert. Für ein Aliquot dieses Ansatzes wurde die Palmitinsäure-Aufnahme bestimmt. Es zeigte sich eine Abnahme auf 73 ± 12 % des Kontrollwerts. Nach anschliessender Inkubation mit Alkalischer Phosphatase (3 U/ml, 20 min.) betrug die Aufnahme 96 ± 4,6 % des Kontrollwerts (n = 3). Der inhibitorische Effekt der Ektophosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme war durch Dephosphorylierung vollständig reversibel.

Einfluss initialer Dephosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme

Es sollte überprüft werden, ob bei vorhergehender Dephosphorylierung der Membranproteine ein Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme festzustellen ist, der möglicherweise der unter Phosphorylierungsbedingungen beobachteten Hemmung entgegengesetzt ist. Dazu wurden die Zellen vor den Aufnahme-Experimenten mit Alkalischer Phosphatase (3 U/ml, 20 min) präinkubiert. Es trat kein signifikanter Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme auf.

4.5 Identifizierung der ektophosphorylierten Proteine

Es war nachzuweisen, dass membranständiges FAT/CD36 unter unseren experimentellen Bedingungen phosphoryliert wurde, um den beobachteten, inhibitorischen Effekt auf die Fettsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten mit der Ektophosphorylierung des Membranproteins FAT/CD36 [Hatmi et al. 1996] erklären zu können.

4.5.1 Nachweis der Ekto-Proteinphosphorylierung von FAT/CD36

Mittels Autoradiografie zeigten wir die cAMP-abhängige Phosphorylierung eines Proteins mit der apparenten Masse von 88 kDa (Abbildung 7). Im Immunoblot wurde die Bande von einem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper (H-300) erkannt. Der Immunoblot zeigte eine Dreifachbande, deren oberer Anteil mit dem Autoradiogramm zur Deckung zu bringen war.

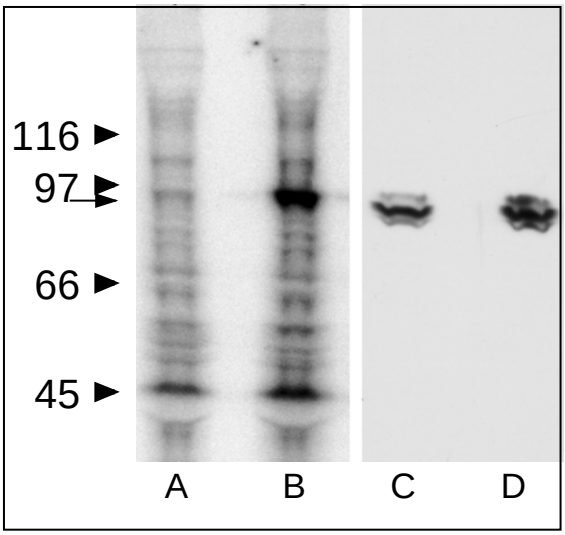


Abb. 7 Identifizierung ektophosphorylierter Proteine 1

A und **B**: Autoradiogramme; Inkubation von **A**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP; **B**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP + 5 µM cAMP; **C** und **D**: Immunoblot; der Blot A-B wurde mit dem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper H-300 inkubiert.

4.5.2 Nachweis des ektophosphorylierten Proteins in der Membranfraktion

Um Sicherheit zu erlangen, dass es sich bei dem Substrat der autoradiografisch gezeigten Phosphorylierung um ein membranständiges Protein handelt, wurden Thrombozyten-membranen präpariert und unter Phosphorylierungsbedingungen inkubiert. Die hauptsächliche Bande bei etwa 88 kDa (Abbildung 7) war auch in der Membranfraktion nachweisbar (Abbildung 8).

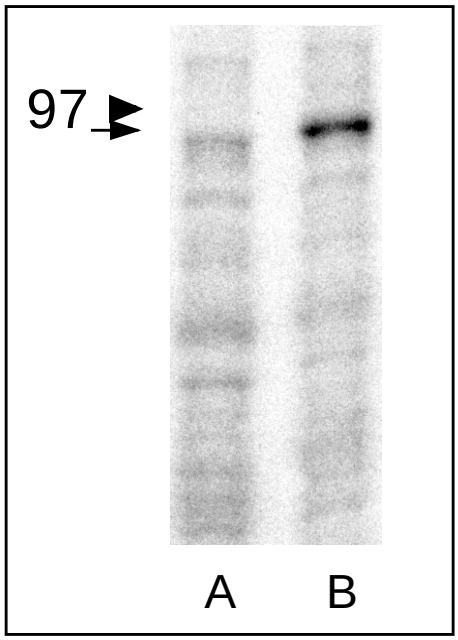


Abb. 8 Nachweis des ektophosphorylierten Proteins in der Membranfraktion

A und **B**: Autoradiogramme; Inkubation der Membranpräparationen von **A**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP; **B**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP + 5 µM cAMP.

4.5.3 Autoradiografische Bande bei 97 kDa

In einzelnen Experimenten lag die autoradiografische Bande des hauptsächlich phosphorylierten Proteins bei etwa 97 kDa. Die Bande des CD36-Immunoblots lag auf demselben Blot bei etwa 88 kDa und liess sich nicht mit der Phosphorylierungsbande zur Deckung bringen (Abbildung 9).

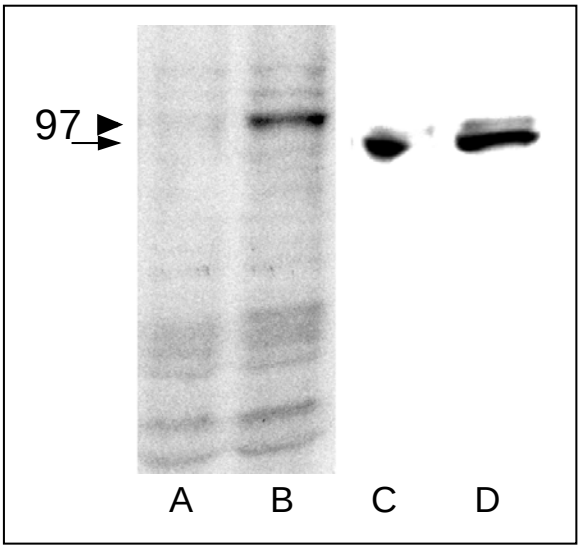


Abb. 9 Identifizierung ektophosphorylierter Proteine 2

A und **B**: Autoradiogramme; Inkubation von **A**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP; **B**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP + 5 µM cAMP; **C** und **D**: Immunoblot; der Blot A-B wurde mit dem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper Mo25 inkubiert.

4.5.4 Bestätigung der Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 durch Deglykosylierung

FAT/CD36 ist ein stark glykosyliertes Protein. Im Anschluss an die Ektophosphorylierung wurde ein Aliquot des Thrombozytenlysats mit N-Glykosidase F behandelt, um die Proteine zu deglykosylieren. Die ohne Deglykosylierung im Autoradiogramm erhaltene Bande bei 88 kDa (Abbildung 7) war nach Glykosidase-Behandlung in der Autoradiografie deutlich abgeschwächt und im Immunoblot gegen CD36 nicht nachzuweisen. Im Autoradiogramm trat eine zuvor nicht vorhandene Bande bei etwa 53 kDa auf. Diese Bande war stärker, wenn die Zellen vor der Deglykosylierung unter Phosphorylierungsbedingungen inkubiert worden waren (Abbildung 10).

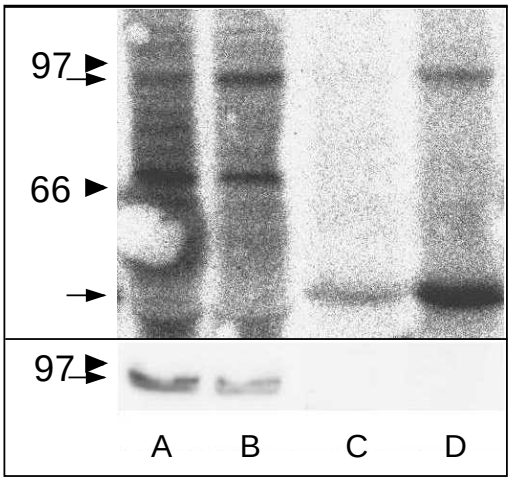


Abb. 10 Identifizierung ektophosphorylierter Proteine 3

oben: **A** bis **D**: Autoradiogramme; Inkubation von **A**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP; **B**: 5 x 10^8 Thrombozyten mit 15 nM γ-[^{32}P]ATP + 5 µM cAMP; **C:** wie A nach anschliessender Deglykosylierung mit N-Glykosidase F, wie unter „Methoden“ beschrieben; **D**: wie B nach anschliessender Deglykosylierung mit N-Glykosidase F.

unten: Immunoblot; der Blot A-D wurde mit dem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper H-300 inkubiert.

5 Diskussion

5.1 Etablierung des Modells

Um den Zusammenhang zwischen der Proteinkinase A-vermittelten Ekto-Phosphorylierung des Membranproteins FAT/CD36 und der zellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren zu untersuchen, haben wir uns für humane Thrombozyten als Modell entschieden, weil

1. bei humanen Thrombozyten die Beteiligung von FAT/CD36 am Transport langkettiger Fettsäuren am Beispiel der Arachidonsäure gezeigt worden ist [Dutta-Roy et al. 1996b],
2. Thrombozyten exogene, langkettige Fettsäuren für die Synthese von Eicosanoiden [Dutta-Roy et al. 1996b], als Substrate der β-Oxidation [Guppy et al. 1997] und für die Synthese von Phospholipiden benötigen,
3. humane Thrombozyten durch freiwillige Blutspenden unkompliziert verfügbar sind und
4. die Erkenntnisse direkt an menschlichen Zellen gewonnen werden und auf Tierversuche verzichtet werden kann.

Die Regulation der initialen Fettsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten wurde anhand der Aufnahme von Palmitinsäure (16:0) untersucht, weil

1. der Anteil der freien Palmitinsäure an der Gesamtkonzentration freier Fettsäuren im Serum (7,5 nM ± 2,5) mit 25 % nach Ölsäure (38 %) am höchsten ist [Richieri und Kleinfeld 1995],
2. für die ATP-Gewinnung in Thrombozyten die Palmitinsäure mit 21 % nach Laktat (24 %) das wichtigste Substrat ist, und
3. bestimmte thrombozytäre Proteine durch Palmitoylierung posttranslationell modifiziert werden und nach Thrombin-Aktivierung verstärkt membranständig oder membran-assoziiert vorliegen [Muszbek et al. 1999]. Palmitinsäure stellt 74 % der Fettsäuren, die über eine Thioester-Bindung kovalent an die Proteine ruhender Thrombozyten gebunden sind, gefolgt von 22 % Stearinsäure und 4 % Ölsäure. Die Inkubation der Zellen mit exogener, freier Palmitinsäure kann diesen Anteil um bis zu 26 % noch weiter erhöhen [Muszbek et al. 1999].

5.1.1 Isolierung humaner Thrombozyten

Humane Thrombozyten sind relativ einfach von den anderen Blutbestandteilen zu trennen. Für unsere Experimente sollten die Thrombozyten in „ruhendem“ Zustand sein („resting platelets“), durften also durch die Isolierung nicht aktiviert werden. Andernfalls kommt es zu Veränderungen im Thrombozyten-Stoffwechsel, die zur Aggregation führen können. Im Idealfall sollten die isolierten Zellen sich wie unter *in vivo*-Verhältnissen verhalten und diese Fähigkeit im Medium einige Stunden behalten.

Wir verwendeten ein von Mustard und Co-Autoren beschriebenes Präparationsprotokoll [Mustard et al. 1989]. Dabei verzichteten wir auf den Zusatz von Apyrase (ATP-Diphosphohydrolase), welche die ATP-abhängigen Schritte unserer Experimente verfälscht hätte, und verwendeten stattdessen PGI_2 zur Aggregationshemmung während der Isolierung. Mustard und Co-Autoren weisen in ihren Ausführungen auf einige grundsätzliche Regeln im Umgang mit Thrombozyten hin. Danach bewahren Thrombozyten ihre Funktionsfähigkeit am besten in einem Zellkultur-Medium mit physiologischen Elektrolyt-Konzentrationen, insbesondere des ionisierten Calciums. Der Zusatz von Albumin als „Schutzprotein“ verhindert die Adhäsion an Reaktionsgefäße und die vorzeitige Aktivierung während der Isolation; zu diesem Zweck verwendeten wir Rinderserum-Albumin (BSA). Glukose muss als wichtige Quelle für Stoffwechselenergie im Medium enthalten sein (1 g/l). Der pH-Wert soll konstant pH = 7,35 betragen und die Temperatur während der gesamten Präparation bei 37 °C gehalten werden. Die Blutspender sollen nüchtern sein und während zwei Wochen vor der Entnahme keine Medikation erhalten haben, insbesondere nicht Acetylsalicylsäure oder andere nicht-steroidale Antiphlogistika. Durch die strikte Berücksichtigung von Mustards Empfehlungen zur experimentellen Handhabung von Thrombozyten gelang es uns, regelmässig qualitativ gute Präparationen zu erhalten.

Unsere Präparationen erreichten bei der aggregometrischen Kontrolle den Normbereich für plättchenreiches Plasma (PRP) und eine normale Latenzzeit zwischen der Zugabe von Kollagen und dem Einsetzen der Aggregation, obwohl es sich um Thrombozyten in Tyrode-Medium statt in Plasma handelte. Die Zellen reagierten also funktionell intakt auf die Stimulation durch Kollagen. In der Literatur wird FAT/CD36 eine entscheidende Rolle in der kollagenstimulierten Aggregation zugeschrieben [Babinska et al. 1996]. Somit kann das Ergebnis nicht nur als erfolgreiche Qualitätskontrolle der Thrombozytenpräparation, sondern darüber hinaus auch als Hinweis auf intaktes FAT/CD36 interpretiert werden.

Die Aggregation nach ADP-Stimulation lag deutlich unterhalb des Normbereichs für PRP. Offenbar wurden die Thrombozyten während der Isolation teilweise refraktär auf ADP. Wir führen das darauf zurück, dass wir bei der Präparation der Thrombozyten auf den Einsatz von Apyrase verzichten mussten. Apyrase spaltet neben ATP auch ADP und verhindert somit, dass die Thrombozyten während der Präparation refraktär auf ADP werden. Für die Untersuchung des Effekts der Ekto-Phosphorylierung von FAT/CD36 mussten wir das aber in Kauf nehmen, weil der Zusatz einer Phosphatase alle folgenden Ergebnisse in Frage gestellt hätte. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass im Tyrode-Medium Faktoren fehlen, die für die ADP-induzierte Aggregation notwendig sind. Durch Zugabe von Fibrinogen kann die Thrombozyten-Aggregation nach ADP-Stimulation erhöht werden [Radomski und Moncada 1983]. Die von uns beobachtete relativ geringe ADP-induzierte Aggregation ist daher zumindest teilweise auch durch das Fehlen von Fibrinogen im Tyrode-Medium zu erklären.

5.1.2 Kinetik der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten

Die zelluläre Aufnahme langkettiger Fettsäuren erfolgt durch Diffusion und proteinvermittelt. In den bisher untersuchten Zelltypen zeigte sich, dass ein wesentlicher Anteil der initialen Fettsäure-Aufnahme durch erleichterten Transport erfolgt (Kap. 1.2.3). Für humane Thrombozyten konnten wir eine nicht-lineare, sättigbare Funktion der Palmitinsäure-Aufnahme in Abhängigkeit von der extrazellulären Palmitinsäure-Konzentration nachweisen. Nach rechnerischer Aufgliederung der Regressionskurve in eine sättigbare und eine lineare Komponente zeigte sich, dass bei Palmitinsäure-Konzentrationen bis etwa 50 nM die lineare Komponente eine untergeordnete Rolle spielt. Der überwiegende Anteil der Palmitinsäure-Aufnahme ist im physiologischen Konzentrationsbereich freier Fettsäuren im Plasma (7,5 nM ± 2,5 nM) [Richieri und Kleinfeld 1995] sättigbar. Damit wiesen wir für unser Modell nach, dass die Untersuchung eines Membranproteins hinsichtlich der Regulation der Fettsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten sinnvoll ist.

5.2 Einfluss der Bedingungen für eine Ekto-Proteinphosphorylierung auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme

Wir konnten unter den Bedingungen der Ekto-Proteinkinase A-vermittelten Proteinphosphorylierung einen signifikanten, inhibitorischen Effekt auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten nachweisen. Die Palmitinsäure-Aufnahme wurde auf bis zu 72 % des Kontrollwerts gehemmt (bei Inkubation mit 5µM cAMP + 0,5 nM ATP). Die durch die Ektophosphorylierung maximal erreichbare Hemmung *in vivo* ist schwierig abzuschätzen. Ein Zusammenhang mit dem initialen Phosphorylierungsstatus von FAT/CD36 ist anzunehmen.

Bei Beginn der *in vitro*-Versuche könnte es Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der Membranproteine gegeben haben. Der hemmende Effekt der Ektophosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme wäre dann nicht maximal. Wenn FAT/CD36 bei Versuchsbeginn durch eine vorausgegangene Dephosphorylierung vollständig dephosphoryliert vorläge, müsste nach dieser These der hemmende Effekt der Ektophosphorylierung maximal sein. Die Dephosphorylierung der Membranproteine vor der Messung der Palmitinsäure-Aufnahme führte jedoch nicht zu einer Verstärkung des hemmenden Effektes. Vermutlich lag FAT/CD36 in unseren Thrombozytenpräparationen bereits nahezu vollständig dephosphoryliert vor.

Umgekehrt war der hemmende Effekt der Ektophosphorylierung durch anschliessende Dephosphorylierung vollständig aufzuheben. Dieses Ergebnis belegt, dass die phosphorylierungsabhängige Hemmung der Palmitinsäure-Aufnahme reversibel ist.

5.3 Abhängigkeit der Hemmung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme von der extrazellulären ATP-Konzentration

Die Hemmung der Palmitinsäure-Aufnahme unter den Bedingungen der Proteinkinase A-vermittelten Ekto-Proteinphosphorylierung ist von der extrazellulären ATP-Konzentration abhängig. ATP-Konzentrationen über 15 nM verminderten den durch die Ektophosphorylierung bewirkten inhibitorischen Effekt, der bei einer ATP-Konzentration von 5 µM nicht mehr signifikant nachzuweisen war. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Aufhebung des inhibitorischen Effekts bei höheren ATP-Konzentrationen durch ATP-Abbauprodukte verursacht wurde. Das schwer spaltbare ATP-Analogon β,γ-ATP hob bei einer Konzentration von 5 µM ebenfalls den Effekt auf. Der Zusatz der ATP-Derivate ADP, AMP und Adenosin zum Inkubations-Medium hatte keinen Effekt auf die Palmitinsäure-

Aufnahme. Bei niedrigen ATP-Konzentrationen wurde der inhibitorische Effekt der Ektophosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme deutlicher. Die maximale Abnahme der Palmitinsäure-Aufnahme auf 72 % des Kontrollwerts wurde bei 0,5 nM ATP erreicht. Bei noch niedrigeren ATP-Konzentrationen wurde der Effekt geringer, und bei weniger als 10 pM ATP war die Palmitinsäure-Aufnahme wieder auf dem Niveau der Kontrollwerte. Der inhibitorische Effekt war bei extrazellulären ATP-Konzentrationen zwischen 10 pM und 15 nM signifikant.

Die extrazellulären ATP-Konzentrationen in verschiedenen Geweben *in vivo* sind schwierig zu bestimmen. Sie sind abhängig von der Menge des freigesetzten cytoplasmatischen ATP, dem Verteilungsvolumen im Extrazellularraum und von katabolischen Enzymen, insbesondere den Ektonukleotidasen [Gordon 1986]. Es wird angenommen, dass die extrazelluläre Nukleotid-Konzentration von ATP-Diphosphohydrolasen kontrolliert wird [el-Moatassim et al. 1992], die dadurch an der Regulation vieler physiologischer Prozesse beteiligt sind [Komoszynski und Wojtczak 1996]. Ein Beispiel dafür ist die Thrombozyten-Aggregation [Marcus und Safier 1993]. Thrombozyten können in granulären Vesikeln gespeichertes ATP bei der Aggregation freisetzen, wobei *in vitro* ATP-Konzentrationen im Plasma von 12 µM gemessen wurden [Ingerman et al. 1979]. Die physiologischen Bedingungen, unter denen ATP und cAMP extrazellulär vorliegen, werden in der Literatur detailliert besprochen [Redegeld et al. 1999, Review].

ATP und β,γ-ATP sind Agonisten des purinergen Rezeptors P_2X_1, der von Thrombozyten exprimiert wird. Es wurde gezeigt, dass ATP für den P_2X_1-Rezeptors eine EC_{50} von 0,6 µM hat [Mahaut-Smith et al. 2000]. Wir nehmen an, dass es bei ATP-Konzentrationen über 15 nM zu einer zunehmenden Bindung von ATP an den P_2X_1-Rezeptor kommt, was dem Effekt der Ektophosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme entgegenwirken könnte. Die Bestätigung dieser Arbeitshypothese mittels Antagonisten des P_2X_1-Rezeptors (Suramin, NF279) [Klapperstück et al. 2000] gelang nicht, was sehr wahrscheinlich an der hohen Albuminbindung der Substanzen liegt. Vermutlich führt die Verdrängung der Palmitinsäure vom Albumin zu einer starken Erhöhung der Konzentration an ungebundenen Fettsäuren in unseren Aufnahme-Experimenten. Die erforderliche Konstanz der Konzentration freier Fettsäuren ist dadurch nicht mehr gegeben. Ein anderer, geeigneter Antagonist des P_2X_1-Rezeptors ist nicht bekannt.

5.4 Zusammenhang zwischen initialer Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten und Ekto-Proteinphosphorylierung

5.4.1 Kriterien für den Nachweis einer Ekto-Phosphorylierung

Unsere Untersuchungen zur Ektokinase-vermittelten Proteinphosphorylierung wurden nach den Kriterien durchgeführt, die Redegeld und Co-Autoren für den Nachweis von Ektophosphorylierungs-Aktivität aufgestellt haben [Redegeld et al. 1999]. Die Einhaltung dieser Kriterien soll Artefakte durch intrazelluläre Proteinkinasen ausschliessen.

Wir verwendeten frisch isolierte, intakte, ruhende Thrombozyten, um die Phosphorylierung von Membranproteinen durch freigesetzte intrazelluläre Proteinkinasen zu verhindern. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium präpariert und inkubiert, weil einerseits Serum Proteinkinasen enthalten kann und andererseits Serumproteine kompetitive Substrate für die Phosphorylierung darstellen können. Wir inkubierten mit niedriger Konzentration von γ-[^{32}P]ATP (15 nM) und für kurze Zeit (10 min), um die Aufnahme markierter ATP-Abbauprodukte durch die Zelle und die anschliessende, intrazelluläre Bildung von markiertem ATP zu vermeiden. Allgemein gilt, dass die intrazelluläre Phosphorylierung durch radiomarkiertes ATP durch den grossen Überschuss an intrazellulärem ATP verhindert wird.

Wie in der Einleitung erwähnt (Kap. 1.4.5), befinden sich die bereits bekannte Phosphorylierungsstelle Thr-91 und weitere potentielle Phosphorylierungsstellen auf der extrazellulären Domäne von FAT/CD36 und stellen daher mögliche Substrate einer Ekto-Phosphorylierung dar.

5.4.2 Bestätigung der Abhängigkeit der initialen Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten von der Ekto-Proteinphosphorylierung

Mehrere Kontrollexperimente wiesen neben der Einhaltung von Redegelds Kriterien darauf hin, dass der beobachtete, inhibitorische Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme durch eine Ekto-Proteinphosphorylierung zu erklären ist.

Die Inkubation humaner Thrombozyten mit ATP oder cAMP allein hatte keinen signifikanten Effekt auf ihre Palmitinsäure-Aufnahme. Auch Adenosin, AMP und ADP hatten keinen Effekt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Hemmung über einen purinergen Rezeptor vermittelt wird, der von ATP oder ATP-Derivaten aktiviert wird. Nur unter den Bedingungen der Ekto-Proteinphosphorylierung, das heisst bei gleichzeitiger Inkubation mit ATP und cAMP, wurde die Palmitinsäure-Aufnahme gesenkt.

Um zu zeigen, dass die Senkung der Palmitinsäure-Aufnahme bei Inkubation mit cAMP und ATP von einer für Phosphorylierungs-Reaktionen verfügbaren γ-Phosphat-Gruppe abhängt, setzten wir anstatt ATP (1 nM) das schwer abbaubare Analogon β,γ-ATP (1 nM) ein. Der inhibitorische Effekt auf die Palmitinsäure-Aufnahme blieb wie erwartet aus.

Unter Phosphorylierungsbedingungen verhinderte die gleichzeitige Inkubation mit dem nicht zellgängigen, spezifischen Proteinkinase A-Inhibitorpeptid *5-24* den inhibitorischen Effekt auf die Fettsäure-Aufnahme. Das Ergebnis weist stark auf einen Proteinkinase A-vermittelten Vorgang hin.

Auch bei gleichzeitiger Inkubation mit Alkalischer Phosphatase blieb der inhibitorische Effekt aus. Es gelang sogar, den zunächst unter Phosphorylierungsbedingungen beobachteten Effekt durch anschliessende Zugabe von Alkalischer Phosphatase vollständig aufzuheben. Die verminderte Aufnahme ist daher nicht auf zeitabhängige Veränderungen der isolierten Thrombozyten zurückzuführen. Die vollständige Reversibilität der Hemmung der Fettsäure-Aufnahme macht deutlich, dass der inhibitorische Effekt tatsächlich von Phosphorylierung und Dephosphorylierung membranständiger Proteine abhängt.

5.4.3 Identifizierung der ektophosphorylierten Proteine

Hatmi und Co-Autoren haben gezeigt, dass das hauptsächliche Substrat der Proteinkinase A-abhängigen Ekto-Phosphorylierung humaner Thrombozyten das Membranprotein FAT/CD36 ist [Hatmi et al. 1996]. Es sollte nachgewiesen werden, dass auch unter unseren experimentellen Bedingungen das membranständige FAT/CD36 phosphoryliert wurde.

Der Immunoblot mit dem spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper H-300 zeigt eine Dreifachbande. Die obere Bande ist mit dem Autoradiogramm zur Deckung zu bringen (Kap. 4.5.1, Abb. 7) und entspricht mit etwa 88 kDa der erwarteten molekularen Masse von FAT/CD36. Möglicherweise hat das Protein im phosphorylierten gegenüber dem dephosphorylierten Zustand eine veränderte elektrophoretische Mobilität. Das würde erklären, warum die Bande in der Autoradiografie, in der nur die phosphorylierte Fraktion durch die ^{32}P-markierte γ-Phosphat-Gruppe zur Darstellung kommt, scharf begrenzt ist, im Immunoblot aber nur eine Fraktion der geteilten Bande damit zur Deckung kommt. Die weiteren Anteile der Dreifachbande im Immunoblot wären dann als nicht-phosphoryliertes FAT/CD36 zu erklären.

Andere Autoren beschreiben ebenfalls unscharfe oder geteilte Banden beim immunologischen Nachweis von FAT/CD36. Gruarin und Co-Autoren detektierten in Monozyten mit dem

spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper Mo91 eine unreife Vorläuferstufe von FAT/CD36 bei 74 kDa und das reife Protein bei 95 kDa. Die elektrophoretische Mobilität von FAT/CD36 war in Gegenwart des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) leicht erhöht, was die Autoren auf das Vorhandensein von Disulphid-Brückenbindungen auf der extrazellulären Domäne des Proteins schliessen lässt [Gruarin et al. 1997]. An Thrombozyten wurde die molekulare Masse von FAT/CD36 (damals als GPIV bekannt) in manchen Arbeiten mit 97 kDa [Phillips und Agin 1977], in anderen mit 87 kDa angegeben [Okumura und Jamieson 1976]. Yamamoto und Co-Autoren versuchten diese Diskrepanz experimentell aufzuklären und bestimmten mit vier verschiedenen, spezifisch gegen CD36 gerichteten Antikörpern die molekulare Masse des thrombozytären FAT/CD36 zu 88,3 ± 2,2 kDa [Yamamoto et al. 1990], konnten aber die Identität der 97 kDa-Bande nicht klären. Offenbar ist der immunologische Nachweis von FAT/CD36 nicht ganz unproblematisch, was vermutlich auf die starke Glykosylierung und die variablen Struktureigenschaften des Proteins zurückzuführen ist.

Vereinzelt hatte auch in unsereren Experimenten die stärkste autoradiografische Bande eine scheinbare Masse von 97 kDa (Kap. 4.5.3, Abb. 9). Der spezifische, gegen CD36 gerichtete Antikörper Mo25 erkannte auf demselben Blot eine Proteinbande von etwa 88 kDa. Aus dieser Beobachtung resultierten Zweifel, ob es sich bei dem unter unseren Versuchsbedingungen hauptsächlich phosphorylierten Protein tatsächlich um FAT/CD36 handelte. Deshalb führten wir zusätzlich zum Immunoblot einen weiteren Kontrollversuch durch. FAT/CD36 ist ein stark glykosyliertes Protein. Nach Deglykosylierung der thrombozytären Proteine im Anschluss an die Phosphorylierung zeigte sich, dass die hauptsächliche Bande bei etwa 88 kDa durch die Deglykosylierung deutlich schwächer wurde. Gleichzeitig trat im Autoradiogramm eine neue, stärkere Bande auf, die mit etwa 53 kDa der zu erwartenden Masse des deglykosylierten Aminosäuregerüsts von FAT/CD36 entsprach. Das Auftreten der neuen Bande war cAMP-abhängig. Dieses Ergebnis lieferte einen wichtigen zusätzlichen Hinweis, dass es sich bei dem unter den Bedingungen der Ektophosphorylierung hauptsächlich phosphorylierten Protein um FAT/CD36 handelt. Die Bande bei 53 kDa wurde im Immunoblot vom spezifischen, gegen CD36 gerichteten Antikörper H-300 nicht erkannt, vermutlich wegen der veränderter Antigeneigenschaften des Proteins infolge der Deglykosylierung.

Eine weitere Möglichkeit, die cAMP-abhängige Ektophosphorylierung sicher FAT/CD36 zuzuordnen, bietet die Immunpräzipitation. Eine erfolgreiche Immunpräzipitation von FAT/CD36 wurde beschrieben [Hatmi et al. 1996]. Der kommerzielle Erwerb des

verwendeten Antikörpers war jedoch nicht möglich, und die Bitte an die Autoren um Bereitstellung des Antikörpers blieb unbeantwortet.

Die Ektophosphorylierung von FAT/CD36 humaner Thrombozyten ist eindeutig gezeigt worden [Hatmi et al. 1996]. Für die Ektophosphorylierung von FAT/CD36 in unseren Experimenten zur Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten spricht

1. die exakte Anwendung der von Hatmi und Co-Autoren beschriebenen Bedingungen für die Ektophosphorylierung von FAT/CD36,
2. das Auftreten einer cAMP-abhängigen Bande von etwa 88 kDa im Autoradiogramm, die mit dem Immunoblot gegen CD36 zur Deckung zu bringen ist,
3. das Auftreten einer neuen Bande von etwa 53 kDa im Autoradiogramm nach Deglykosylierung der Proteine bei gleichzeitiger, starker Abschwächung der cAMP-abhängigen 88 kDa-Bande.

Wir schlagen daher die Ektophosphorylierung von FAT/CD36 als Mechanismus zur kurzfristigen Regulation der proteinvermittelten Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten vor.

5.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Die durch membranständiges FAT/CD36 vermittelte, zelluläre Aufnahme langkettiger Fettsäuren ist ein relativ neuer Aspekt im Lipid-Stoffwechsel. Untersuchungen an FAT/CD36-defizienten Individuen [Ikeda 1999, Review] sowie an verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellen liefern Hinweise auf Zusammenhänge zwischen der abnormalen Expression oder Funktion von FAT/CD36 und der Entstehung von Arteriosklerose [Nicholson et al. 2001, Review], Insulinresistenz und Typ2-Diabetes [Glatz et al. 2002, Review], Fettsucht [Ibrahimi und Abumrad 2002, Review] sowie kardialer Hypertrophie und diabetischer Kardiomyopathie [Brinkmann et al. 2002, Review].

Angesichts der Beteiligung der proteinvermittelten Fettsäure-Aufnahme an der Pathogenese häufiger Stoffwechselerkrankungen ist es wahrscheinlich, dass das Gebiet in Zukunft klinische Bedeutung gewinnen wird. Die extrazellulären Phosphorylierungsstellen membranständiger Proteine könnten geeignete, neue Ansatzpunkte pharmakologischer Interventionen darstellen [Redegeld et al. 1999, Review]. Dadurch könnte die Regulation der Fettsäure-Aufnahme durch die Ektophosphorylierung von FAT/CD36 klinische Relevanz gewinnen.

6 Zusammenfassung

Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der Proteinkinase A-vermittelten Ektophosphorylierung des Membranproteins FAT/CD36 [Hatmi et al. 1996] und der zellulären Aufnahme langkettiger Fettsäuren. Unter den Bedingungen der Ektophosphorylierung von FAT/CD36 zeigten wir einen inhibitorischen Effekt auf die initiale Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten. Damit kann erstmalig ein Mechanismus für die kurzfristige Regulation der proteinvermittelten Aufnahme langkettiger Fettsäuren vorgeschlagen werden.

Für die Bearbeitung der Fragestellung wurden die Isolation „ruhender“, morphologisch und funktionell intakter humaner Thrombozyten und eine Methode zur Messung der initialen Palmitinsäure-Aufnahme etabliert.
Die Kinetik der Palmitinsäure-Aufnahme humaner Thrombozyten wurde charakterisiert und bestätigt, dass ein wesentlicher Anteil der initialen Aufnahme proteinvermittelt erfolgt.
Die von Hatmi und Co-Autoren beschriebene Proteinkinase A-vermittelte, cAMP-abhängige Ektophosphorylierung von FAT/CD36 konnte unter unseren experimentellen Bedingungen nachvollzogen werden.
Die Ektophosphorylierung von FAT/CD36 ging mit einer signifikanten Abnahme der initialen Palmitinsäure-Aufnahme einher. Die maximale Abnahme auf 72 % des Kontrollwerts wurde bei einer extrazellulären ATP-Konzentration von 0,5 nM erreicht. Der inhibitorische Effekt liess sich durch Co-Inkubation mit dem spezifischen Proteinkinase A-Inhibitorpeptid *5-24* oder mit β-γ-ATP aufheben. Der Effekt war durch Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase vollständig reversibel.
Bei extrazellulären ATP-Konzentrationen zwischen 10 pM und 15 nM war der inhibitorische Effekt der Ektophosphorylierung auf die Palmitinsäure-Aufnahme signifikant. ATP-Konzentrationen über 15 nM verminderten den Effekt, bei über 5 µM ATP war kein Effekt nachzuweisen. Wir konnten ausschliessen, dass die Aufhebung durch ATP-Abbauprodukte verursacht wurde. Unsere Beobachtungen deuten auf einen regulatorischen Einfluss höherer extrazellulärer ATP-Konzentrationen, der dem inhibitorischen Effekt der Ektophosphorylierung von FAT/CD36 auf die Fettsäure-Aufnahme entgegenwirkt.

7 Literatur

1. Abumrad N. A., Coburn C. und Ibrahimi A.: Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm, Biochim. Biophys. Acta 1999; *1441(1):*4-13

2. Abumrad N. A., Harmon C. und Ibrahimi A.: Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process, J. Lipid Res. 1998; *39(12):*2309-18

3. Abumrad N. A., el-Maghrabi M. R., Amri E. Z., Lopez E. und Grimaldi P. A.: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36, J. Biol. Chem. 1993; *268(24):*17665-8

4. Abumrad N. A., Park J. H. und Park C. R.: Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein, J. Biol. Chem. 1984; *259(14):*8945-53

5. Abumrad N. A., Perkins R. C., Park J. H. und Park C. R.: Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte, J. Biol. Chem. 1981; *256(17):*9183-91

6. Amri E. Z., Bertrand B., Ailhaud G. und Grimaldi P.: Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression, J. Lipid Res. 1991; *32(9):*1449-56

7. Asch A. S., Barnwell J., Silverstein R. L. und Nachman R. L.: Isolation of the thrombospondin membrane receptor, J. Clin. Invest. 1987; *79(4):*1054-61

8. Asch A. S., Liu I., Briccetti F. M., Barnwell J. W., Kwakye B. F., Dokun A., Goldberger J. und Pernambuco M.: Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain, Science 1993; *262(5138):*1436-40

9. Babinska A., Ehrlich Y. H. und Kornecki E.: Activation of human platelets by protein kinase C antibody: role for surface phosphorylation in homeostasis, Am. J. Physiol. 1996; *271(5):*H2134-44

10. Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., Smart E. J., Anderson R. G., Xu S. und Krieger M.: Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae, J Biol Chem 1997; *272(20):*13242-9

11. Baenziger N. L. und Majerus P. W.: Isolation of human platelets and platelet surface membranes, Methods Enzymol. 1974; *31:*149-55

12. Baillie A. G., Coburn C. T. und Abumrad N. A.: Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog, J. Membr. Biol. 1996; *153(1):*75-81

13. Banaszak L., Winter N., Xu Z., Bernlohr D. A., Cowan S. und Jones T. A.: Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins, Adv. Protein Chem. 1994; *45:*89-151

14. Bankir L., Ahloulay M., Devreotes P. N. und Parent C. A.: Extracellular cAMP inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved?, Am. J. Physiol. 2002; *282(3):*F376-392

15. Batenburg J. J., Longmore W. J. und van Golde L. M.: The synthesis of phosphatidylcholine by adult rat lung alveolar type II epithelial cells in primary culture, Biochim Biophys Acta 1978; *529(1):*160-70

16. Berk P. D., Potter B. J., Sorrentino D., Stump D., Kiang C. L., Zhou S. L., Horio Y. und Wada H.: Hepatocellular fatty acid uptake is mediated by a plasma membrane fatty acid binding protein closely related to mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990a; *585:*379-85

17. Berk P. D., Potter B. J. und Stremmel W.: Role of plasma membrane ligand-binding proteins in the hepatocellular uptake of albumin-bound organic anions, Hepatology 1987; *7(1):*165-76

18. Berk P. D., Wada H., Horio Y., Potter B. J., Sorrentino D., Zhou S. L., Isola L. M., Stump D., Kiang C. L. und Thung S.: Plasma membrane fatty acid-binding protein and mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase of rat liver are related, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1990b; *87(9):*3484-8

19. Bligh E. G. und Dyer W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. 1959; *193:*911-7

20. Blom N., Gammeltoft S. und Brunak S.: Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, J. Mol. Biol. 1999; *294(5):*1351-62

21. Bonen A., Dyck D. J., Ibrahimi A. und Abumrad N. A.: Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36, Am. J. Physiol. 1999; *276(4):*E642-49

22. Bonen A., Luiken J. J., Liu S., Dyck D. J., Kiens B., Kristiansen S., Turcotte L. P., van der Vusse G. J. und Glatz J. F.: Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles, Am. J. Physiol. 1998; *275(3):*E471-78

23. Brinkmann J. F., Abumrad N. A., Ibrahimi A., van der Vusse G. J. und Glatz J. F.: New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36, Biochem. J. 2002; *367:*561-70

24. Burnstock G.: Overview. Purinergic mechanisms, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990; *603:*1-18

25. Calvo D., Gomez-Coronado D., Suarez Y., Lasuncion M. A. und Vega M. A.: Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL, J. Lipid Res. 1998; *39(4):*777-88

26. Chander A. und Fisher A. B.: Choline-phosphate cytidyltransferase activity and phosphatidylcholine synthesis in rat granular pneumocytes are increased with exogenous fatty acids, Biochim. Biophys. Acta 1988; *958(3):*343-51

27. Clemetson K. J.: Platelet activation: signal transduction via membrane receptors, Thromb. Haemost. 1995; *74(1):*111-6

28. Clemetson K. J., Pfueller S. L., Luscher E. F. und Jenkins C. S.: Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography, Biochim. Biophys. Acta 1977; *464(3):*493-508

29. Clezardin P., Frappart L., Clerget M., Pechoux C. und Delmas P. D.: Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast, Cancer Res. 1993; *53(6):*1421-30

30. Coburn C. T., Knapp F. J., Febbraio M., Beets A. L., Silverstein R. L. und Abumrad N. A.: Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice, J. Biol. Chem. 2000; *275(42):*32523-9

31. Connelly M. A., Klein S. M., Azhar S., Abumrad N. A. und Williams D. L.: Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake, J. Biol. Chem. 1999; *274(1):*41-7

32. Dutta-Roy A. K.: Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins, Cell. Mol. Life Sci. 2000; *57(10):*1360-72

33. Dutta-Roy A. K., Crosbie L. C., Gordon M. J. und Campbell F. M.: Platelet membrane glycoprotein IV (CD36) is involved in arachidonic acid induced-platelet aggregation, Biochem. Soc. Trans. 1996a; *24(2):*167S

34. Dutta-Roy A. K., Gordon M. J., Campbell F. M. und Crosbie L. C.: Arachidonic acid uptake by human platelets is mediated by CD36, Platelets 1996b; 7291-5

35. el-Moatassim C., Dornand J. und Mani J. C.: Extracellular ATP and cell signalling, Biochim. Biophys. Acta 1992; *1134(1):*31-45

36. Endemann G., Stanton L. W., Madden K. S., Bryant C. M., White R. T. und Protter A. A.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein, J. Biol. Chem. 1993; *268(16):*11811-6

37. Febbraio M., Abumrad N. A., Hajjar D. P., Sharma K., Cheng W., Pearce S. F. und Silverstein R. L.: A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism, J. Biol. Chem. 1999; *274(27):*19055-62

38. Febbraio M., Hajjar D. P. und Silverstein R. L.: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism, J. Clin. Invest. 2001; *108(6):*785-791

39. Fernandez-Ruiz E., Armesilla A. L., Sanchez-Madrid F. und Vega M. A.: Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2, Genomics 1993; *17(3):*759-761

40. Fluiter K. und van-Berkel T. J.: Scavenger receptor B1 (SR-B1) substrates inhibit the selective uptake of high-density-lipoprotein cholesteryl esters by rat parenchymal liver cells, Biochem. J. 1997; *326(2):*515-9

41. Franc N. C., Dimarcq J. L., Lagueux M., Hoffmann J. und Ezekowitz R. A.: Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells, Immunity 1996; *4(5):*431-43

42. Fujii S., Kawaguchi H. und Yasuda H.: Isolation and partial characterization of an amphiphilic 56-kDa fatty acid binding protein from rat renal basolateral membrane, J. Biochem. Tokyo. 1987; *101(3):*679-84

43. Glatz J. F., Bonen A. und Luiken J. J.: Exercise and insulin increase muscle fatty acid uptake by recruiting putative fatty acid transporters to the sarcolemma, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 2002; *5(4):*365-70

44. Glatz J. F., Luiken J. J., Van-Nieuwenhoven F. A. und van der Vusse G. J.: Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 1997; *57(1):*3-9

45. Gordon J. L.: Extracellular ATP: effects, sources and fate, Biochem. J. 1986; *233(2):*309-19

46. Goresky C. A., Stremmel W., Rose C. P., Guirguis S., Schwab A. J., Diede H. E. und Ibrahim E.: The capillary transport system for free fatty acids in the heart, Circ. Res. 1994; *74(6):*1015-26

47. Greenwalt D. E., Lipsky R. H., Ockenhouse C. F., Ikeda H., Tandon N. N. und Jamieson G. A.: Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine, Blood 1992; *80(5):*1105-15

48. Greenwalt D. E., Scheck S. H. und Rhinehart J. T.: Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet, J. Clin. Invest. 1995; *96(3):*1382-8

49. Greenwalt D. E., Tandon N. N. und Jamieson G. A.: Role of carbohydrate on the conformation of human and bovine GPIV (CD36), Thromb. Haemost. 1991; *65:*1153

50. Greenwalt D. E., Watt K. W., So O. Y. und Jiwani N.: PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV), Biochemistry 1990; *29(30):*7054-9

51. Grimaldi P. A., Knobel S. M., Whitesell R. R. und Abumrad N. A.: Induction of aP2 gene expression by nonmetabolized long-chain fatty acids, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; *89(22):*10930-4

52. Gruarin P., Sitia R. und Alessio M.: Formation of one or more intrachain disulphide bonds is required for the intracellular processing and transport of CD36, Biochem. J. 1997; *328(2):*635-42

53. Guppy M., Abas L., Neylon C., Whisson M. E., Whitham S., Pethick D. W. und Niu X.: Fuel choices by human platelets in human plasma, Eur. J. Biochem. 1997; *244(1):*161-7

54. Guthmann F., Haupt R., Looman A. C., Spener F. und Rüstow B.: Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes, Am. J. Physiol. 1999; *277(1):*L191-6

55. Hamilton J. A.: Fatty acid transport: difficult or easy?, J. Lipid Res. 1998; *39(3):*467-81

56. Harmon C. M. und Abumrad N. A.: Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids, J. Membr. Biol. 1993; *133(1):*43-9

57. Harmon C. M., Luce P. und Abumrad N. A.: Labelling of an 88 kDa adipocyte membrane protein by sulpho-N-succinimidyl long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport, Biochem. Soc. Trans. 1992; *20(4):*811-3

58. Harmon C. M., Luce P., Beth A. H. und Abumrad N. A.: Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport, J. Membr. Biol. 1991; *121(3):*261-8

59. Hatmi M., Gavaret J. M., Elalamy I., Vargaftig B. B. und Jacquemin C.: Evidence for cAMP-dependent platelet ectoprotein kinase activity that phosphorylates platelet glycoprotein IV (CD36), J. Biol. Chem. 1996; *271(40):*24776-80

60. Ibrahimi A. und Abumrad N. A.: Role of CD36 in membrane transport of long-chain fatty acids, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 2002; *5(2):*139-45

61. Ibrahimi A., Bonen A., Blinn W. D., Hajri T., Li X., Zhong K., Cameron R. und Abumrad N. A.: Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin, J. Biol. Chem. 1999; *274(38):*26761-6

62. Ibrahimi A., Sfeir Z., Magharaie H., Amri E. Z., Grimaldi P. und Abumrad N. A.: Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport, Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; *93(7):*2646-51

63. Ikeda H.: Platelet membrane protein CD36, Hokkaido Igaku Zasshi. 1999; *74(2):*99-104

64. Ingerman C. M., Smith J. B. und Silver M. J.: Direct measurement of platelet secretion in whole blood, Thromb. Res. 1979; *16(3-4):*335-44

65. Kashiwagi H., Tomiyama Y., Honda S., Kosugi S., Shiraga M., Nagao N., Sekiguchi S., Kanayama Y., Kurata Y. und Matsuzawa Y.: Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C-->T substitution (proline90-->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency, J. Clin. Invest. 1995; *95(3):*1040-6

66. Kieffer N., Bettaieb A., Legrand C., Coulombel L., Vainchenker W., Edelman L. und Breton-Gorius J.: Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor, Biochem. J. 1989; *262(3):*835-42

67. Klapperstück M., Buttner C., Nickel P., Schmalzing G., Lambrecht G. und Markwardt F.: Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X(1) and P2X(7) receptors, Eur. J. Pharmacol. 2000; *387(3):*245-52

68. Kleinfeld A. M., Chu P. und Romero C.: Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting, Biochemistry 1997; *36(46):*14146-58

69. Kobylka D. und Carraway K. L.: Proteolytic digestion of proteins of the milk fat globule membrane, Biochim. Biophys. Acta 1973; *307(1):*133-40

70. Kolleck I., Guthmann F., Ladhoff A. M., Tandon N. N., Schlame M. und Rüstow B.: Cellular cholesterol stimulates acute uptake of palmitate by redistribution of fatty acid translocase in type II pneumocytes, Biochemistry 2002; *41(20):*6369-75

71. Komoszynski M. und Wojtczak A.: Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases, Biochim. Biophys. Acta 1996; *1310(2):*233-41

72. Kosower N. S. und Kosower E. M.: Thiol labeling with bromobimanes, Methods Enzymol. 1987; *143:*76-84

73. Kübler D., Pyerin W. und Kinzel V.: Protein kinase activity and substrates at the surface of intact HeLa cells, J. Biol. Chem. 1982; *257(1):*322-9

74. Kyhse-Andersen J.: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, J. Biochem. Biophys. Methods 1984; *10(3-4):*203-9

75. Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970; *227(259):*680-5

76. Luiken J. J., Van-Nieuwenhoven F. A., America G., van der Vusse G. J. und Glatz J. F.: Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins, J. Lipid Res. 1997; *38(4):*745-58

77. Mahaut-Smith M. P., Ennion S. J., Rolf M. G. und Evans R. J.: ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets, Br. J. Pharmacol. 2000; *131(1):*108-14

78. Maniscalco W. M., Finkelstein J. N. und Parkhurst A. B.: Effects of exogenous fatty acids and inhibition of de novo fatty acid synthesis on disaturated phosphatidylcholine production by fetal lung cells and adult type II cells, Exp. Lung Res. 1989; *15(3):*473-89

79. Maniscalco W. M., Stremmel W. und Heeney C. M.: Uptake of palmitic acid by rabbit alveolar type II cells, Am. J. Physiol. 1990; *259(4):*L206-12

80. Marcus A. J. und Safier L. B.: Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis, FASEB J 1993; *7(6):*516-22

81. Matveev S., van der Westhuyzen D. R. und Smart E. J.: Co-expression of scavenger receptor-BI and caveolin-1 is associated with enhanced selective cholesteryl ester uptake in THP-1 macrophages, J. Lipid Res. 1999; *40(9):*1647-54

82. Murphy E. J., Prows D. R., Jefferson J. R. und Schroeder F.: Liver fatty acid-binding protein expression in transfected fibroblasts stimulates fatty acid uptake and metabolism, Biochim. Biophys. Acta 1996; *1301(3):*191-8

83. Mustard J. F., Kinlough-Rathbone R. L. und Packham M. A.: Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing, Methods Enzymol. 1989; *169:*3-11

84. Muszbek L., Haramura G., Cluette-Brown J. E., van Cott E. M. und Laposata M.: The pool of fatty acids covalently bound to platelet proteins by thioester linkages can be altered by exogenously supplied fatty acids, Lipids 1999; *34 (Suppl.):*331-7

85. Nicholson A. C., Han J., Febbraio M., Silverstein R. L. und Hajjar D. P.: Role of CD36, the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis, Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001; *947:*224-8

86. Noy N., Donnelly T. M. und Zakim D.: Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver, Biochemistry 1986; *25(8):*2013-21

87. Nozaki S., Tanaka T., Yamashita S., Sohmiya K., Yoshizumi T., Okamoto F., Kitaura Y., Kotake C., Nishida H., Nakata A. et al. CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: complete myocardial accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency, Mol. Cell. Biochem. 1999; *192(1-2):*129-35

88. Okumura T. und Jamieson G. A.: Platelet glycocalicin. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface, J. Biol. Chem. 1976; *251(19):*5944-9

89. Oquendo P., Hundt E., Lawler J. und Seed B.: CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes, Cell 1989; *58(1):*95-101

90. Pearce S. F., Wu J. und Silverstein R. L.: A carboxyl terminal truncation mutant of CD36 is secreted and binds thrombospondin: evidence for a single transmembrane domain, Blood 1994; *84(2):*384-9

91. Phillips D. R. und Agin P. P.: Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977; *75(4):*940-7

92. Poirier H., Degrace P., Niot I., Bernard A. und Besnard P.: Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP), Eur. J. Biochem. 1996; *238(2):*368-73

93. Prieto R. M., Stremmel W., Sales C. und Tur J. A.: Oleic acid uptake by jejunal and ileal rat brush border membrane vesicles, Eur. J. Med. Res. 1996; *1(4):*199-203

94. Radomski M. und Moncada S.: An improved method for washing of human platelets with prostacyclin, Thromb. Res. 1983; *30(4):*383-9

95. Redegeld F. A., Caldwell C. C. und Sitkovsky M. V.: Ecto-protein kinases: ecto-domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation?, Trends. Pharmacol. Sci. 1999; *20(11):*453-9

96. Richieri G. V., Anel A. und Kleinfeld A. M.: Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB, Biochemistry 1993; *32(29):*7574-80

97. Richieri G. V. und Kleinfeld A. M.: Unbound free fatty acid levels in human serum, J. Lipid Res. 1995; *36(2):*229-40

98. Rigotti A., Acton S. L. und Krieger M.: The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids, J. Biol. Chem. 1995; *270(27):*16221-4

99. Rüstow B. und Kunze D.: The availability of endogenous and exogenous disaturated diacylglycerol for the diacylglycerol-consuming reactions in lung microsomes, Biochim. Biophys. Acta 1984; *796(3):*359-63

100. Ryeom S. W., Silverstein R. L., Scotto A. und Sparrow J. R.: Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36, J. Biol. Chem. 1996; *271(34):*20536-9

101. Savill J., Hogg N. und Haslett C.: Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death, Chest 1991; *99(3 Suppl.):*S6-7

102. Schaffer J. E. und Lodish H. F.: Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein, Cell 1994; *79(3):*427-36

103. Schlesinger M. J., Veit M. und Schmidt M. F. G.: Palmitoylation of Cellular and Viral Proteins; in Schlesinger M. J. (Hrsg.): Lipid Modifications of Proteins, CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1994, S.1-134

104. Schmider W., Fahr A., Voges R., Gerok W. und Kurz G.: Irreversible inhibition of hepatic fatty acid salt uptake by photoaffinity labeling with 11, 11-azistearate, J. Lipid Res. 1996; *37(4):*739-53

105. Sefton B. M. und Buss J. E.: The covalent modification of eukaryotic proteins with lipid, J. Cell. Biol. 1987; *104(6):*1449-53

106. Sfeir Z., Ibrahimi A., Amri E., Grimaldi P. und Abumrad N. A.: Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 1997; *57(1):*17-21

107. Silverstein R. L. und Febbraio M.: CD36 and atherosclerosis, Curr. Opin. Lipidol. 2000; *11(5):*483-491

108. Sorrentino D., Stump D., Potter B. J., Robinson R. B., White R., Kiang C. L. und Berk P. D.: Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut, J. Clin. Invest. 1988; *82(3):*928-35

109. Sorrentino D., Stump D., van Ness K., Simard A., Schwab A. J., Zhou S. L., Goresky C. A. und Berk P. D.: Oleate uptake by isolated hepatocytes and the perfused rat liver is competitively inhibited by palmitate, Am. J. Physiol. 1996; *270(2):*G385-92

110. Spector A. A.: Fatty acid binding to plasma albumin, J. Lipid Res. 1975; *16(3):*165-79

111. Storch J. und Thumser A. E.: The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins, Biochim. Biophys. Acta 2000; *1486(1):*28-44

112. Stremmel W., Kochwa S. und Berk P. D.: Studies of oleate binding to rat liver plasma membranes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983; *112(1):*88-95

113. Stremmel W., Lotz G., Strohmeyer G. und Berk P. D.: Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes, J. Clin. Invest. 1985; *75(3):*1068-76

114. Stremmel W., Strohmeyer G. und Berk P. D.: Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein, Proc. Natl. Acad. Sci. 1986; *83(11):*3584-8

115. Tanaka T., Nakata T., Oka T., Ogawa T., Okamoto F., Kusaka Y., Sohmiya K., Shimamoto K. und Itakura K.: Defect in human myocardial long-chain fatty acid uptake is caused by FAT/CD36 mutations, J. Lipid Res. 2001; *42(5):*751-9

116. Tandon N. N., Lipsky R. H., Burgess W. H. und Jamieson G. A.: Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36), J. Biol. Chem. 1989; *264(13):*7570-5

117. Tao N., Wagner S. J. und Lublin D. M.: CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails, J. Biol. Chem. 1996; *271(37):*22315-20

118. Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J. G., Thomazy V. A. und Evans R. M.: PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL, Cell 1998; *93(2):*241-52

119. Trigatti B. L., Anderson R. G. und Gerber G. E.: Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; *255(1):*34-9

120. Trigatti B. L., Mangroo D. und Gerber G. E.: Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes, J. Biol. Chem. 1991; *266(33):*22621-5

121. Trotter P. J., Ho S. Y. und Storch J.: Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells, J. Lipid Res. 1996; *37(2):*336-46

122. Uchiyama A., Aoyama T., Kamijo K., Uchida Y., Kondo N., Orii T. und Hashimoto T.: Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase, J. Biol. Chem. 1996; *271(48):*30360-5

123. Uittenbogaard A., Shaul P. W., Yuhanna I. S., Blair A. und Smart E. J.: High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae, J. Biol. Chem. 2000; *275(15):*11278-83

124. Van-Nieuwenhoven F. A., van der Vusse G. J. und Glatz J. F.: Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins, Lipids 1996; *31(Suppl.):*S223-27

125. Van-Nieuwenhoven F. A., Verstijnen C. P., Abumrad N. A., Willemsen P. H., Van-Eys G. J., van der Vusse G. J. und Glatz J. F.: Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995; *207(2):*747-52

126. Vega M. A., Segui-Real B., Garcia J. A., Cales C., Rodriguez F., Vanderkerckhove J. und Sandoval I. V.: Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36, J. Biol. Chem. 1991; *266(25):*16818-24

127. Walaas S. I. und Ostvold A. C.: Analysis of Protein Phosphorylation in Intact Cells and Extracts; in Hemmings H. C. jr. (Hrsg.): Regulatory Protein Modification: Techniques and Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, USA 1997, S.1-43

128. Witt W., Kolleck I., Fechner H., Sinha P. und Rustow B.: Regulation by vitamin E of the scavenger receptor BI in rat liver and HepG2 cells, J. Lipid Res. 2000; *41(12):*2009-16

129. Yamamoto N., de-Romeuf C., Tandon N. N. und Jamieson G. A.: A resolution of reported discrepancies in the characteristics of platelet glycoproteins IV (GPIV) and IIIb (GPIIIb), Thromb. Haemost. 1990; *63(1):*97-102

130. Zhou S. L., Stump D., Sorrentino D., Potter B. J. und Berk P. D.: Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein, J. Biol. Chem. 1992; *267(20):*14456-61

Lebenslauf

	Philipp Henning Mähl
14.5.1974	geboren in Hamburg
	Staatsangehörigkeit: deutsch
1986-93	Ökumenisches Gymnasium, Bremen
27.5.1993	Abitur
10/93-12/94	Grundwehr- und Wehrersatzdienst, Goslar und Bremen
4/95-3/96	Studium der Rechtswissenschaft,
	Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
4/96-3/99	Studium der Humanmedizin,
	Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
23.3.1999	1. Staatsexamen
seit 4/99	Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin,
	Humboldt-Universität Berlin
15.9.2003	2. Staatsexamen
4/99	Beginn der Dissertationsarbeit im Lipidlabor der
	Klinik für Neonatologie der Charité Berlin, Campus Mitte,
	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bernd Rüstow
9/00-8/01	Forschungstätigkeit im „Lung Biology Program“ des
	Hospital for Sick Children Research Institute, Toronto, Kanada,
	Arbeitsgruppe Dr. Martin Post,
	im Rahmen des „Biomedical Sciences Exchange Program
	between Europe and North America“

Publikationen

Originalarbeiten

Guthmann F., Maehl P., Preiss J., Kolleck I. und Rüstow B.
„Ectoprotein kinase-mediated phosphorylation of FAT/CD36 regulates palmitate uptake of human platelets“
Cellular and Molecular Life Sciences 2002; 59(11):1999-2003

Arnold U., Langkafel P., Peppel L. und Maehl P.
„Medizinstudium goes online? Erwartungen, Erfahrung und technische Ausstattung der Studierenden - Repräsentative Befragung Studierender der Charité in den Jahren 2000/2001“
Medizinische Ausbildung 2002; 19:38-43. Supplement der Zeitschrift „Das Gesundheitswesen“, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart

Kongressbeiträge

Maehl P., Guthmann F., Preiss J., Kolleck I. und Rüstow B.
„Ectoprotein kinase-mediated phosphorylation of FAT/CD36 impairs palmitate uptake of human platelets“
Vortrag auf der 13th European Students` Conference,
Biomedicine/Biochemistry Session,
Charité Berlin, 2. November 2002

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt, und die verwendeten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, im Januar 2003