

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hugo Van Aken, FRCA, FANZA-

Die Wirkung Nichtsteroidaler Antiphlogistika
auf die G- Protein- Kaskade

INAUGURAL- DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von Rathmann, Pia Franziska
aus Bielefeld

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med.V. Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Hahnenkamp

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. D. Palmes

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr.h.c. Hugo Van Aken
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. K. Hahnenkamp
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. D. Palmes

Zusammenfassung

„Die Wirkung der Nichtsteroidalen Antiphlogistika, Aspirin und Diclofenac, auf die G-Protein-Kaskade“
Rathmann, Pia Franziska

Einleitung: Es ist offensichtlich, dass die Bandbreite der pharmakologischen Wirkungen von nichtsteroidalen Antiphlogistika (nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs) nicht allein auf die seit langem bekannte Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX) zurückgeführt werden kann. Es wird vermutet, dass die Hemmung der Prostaglandinsynthese zwar der Haupteffekt, aber nicht der einzige Effekt der NSAID- Wirkung ist. Einige COX- unabhängige Wirkungen der NSAIDs wurden bereits beobachtet. Unter anderem gehört ein antagonistischer Effekt auf G- Proteine dazu. Angenommen werden Wechselwirkungen mit dem G- Protein, die allerdings bisher nur in In-vitro-Studien mit [³⁵S]GTPγS (Guadenosintrisphosphat) auf Membranen gereinigter Neutrophiler gezeigt wurden und noch nicht an funktionsfähigen Zellen getestet und bewiesen worden sind.

Methodik: Als zu untersuchender Rezeptor wurde der G- Protein- gekoppelte LPA- Rezeptor gewählt. LPA- Rezeptoren sind physiologischerweise auf den Oozyten des *Xenopus laevis* Krallenfrosches ausgebildet, wodurch sich jegliche biotechnische Manipulationen an den Zellen erübrigen.

Lysophosphatidsäure ist eine in ihrer Wirkung gut untersuchte Substanz. Sie agiert als Mediator von Signalen, die sie über spezifische G- Protein- gekoppelte- LPA- Rezeptoren überträgt und so Koagulation und Entzündung induziert.

80% aller bekannten Membran- Rezeptoren sind G- Protein- gekoppelte Rezeptoren, GPCR, weshalb Wechselwirkungen mit dem kleinen Molekül bereits große Auswirkungen haben können.

Mit der Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode wurde ein System gefunden, welches ermöglicht, die Pharmakologie des Rezeptors an funktionsfähigen Zellen zu untersuchen. Das Modell ist ein sensibles und etabliertes System zur Darstellung von Membranpotentialen in großen Zellen, wie den Oozyten des *Xenopus laevis* Krallenfrosches. Es besteht zudem die Möglichkeit, die dem zu untersuchenden Rezeptor nachgeschaltete Signalübertragungskaskade durch intrazelluläre Injektion bewährter Substanzen zu manipulieren. Die Versuche wurden am 06.06.2000 durch das Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt der Bezirksregierung Münster unter dem Aktenzeichen A 40/2000 genehmigt.

Ergebnisse: Die halbmaximale effektive Konzentration (EC₅₀) von LPA in diesem Versuch beträgt $3,16 \pm 0,26 \times 10^{-7} \text{M}$. Nach zehnminütiger Inkubation der Zellen in den zu testenden NSAIDs, Aspirin und Diclofenac, wird die LPA- Rezeptor- Funktion konzentrationsabhängig gehemmt. Die Konzentrationen mit dem halbmaximalen inhibierenden Effekt (IC₅₀) betragen: $9,6 \pm 4,6 \times 10^{-7} \text{M}$ bzw. $1,90 \pm 0,67 \times 10^{-6} \text{M}$. Die Inhibition ist reversibel. Um den genauen Angriffspunkt der NSAIDs innerhalb des Signalweges festzustellen, wird untersucht, ob die über der Zelle durch intrazelluläre Injektion von IP₃, G418, GTPγS und AlF₄⁻ ausgelösten Ströme (I_{Cl(Ca)}) ebenfalls durch die Inkubation in den oben genannten Pharmaka beeinflusst werden. Allein die durch GTPγS ausgelösten Ströme (I_{Cl(Ca)}) werden signifikant auf 41% bzw. 46% gesenkt und deuten somit auf einen G- Protein abhängigen Effekt hin.

Diskussion: An funktionsfähigen Zellen konnte gezeigt werden, dass Aspirin und Diclofenac den G- Protein- gekoppelten LPA- Rezeptor konzentrationsabhängig und reversibel hemmen. Der Wirkort innerhalb der G- Protein- Kaskade konnte auf die GTP- bindenden Seite des G- Proteins eingegrenzt werden. Der IC₅₀ der beiden NSAIDs liegt im Bereich klinisch relevanter Konzentrationen.

Dies könnte einen Teil der nicht geklärten, COX- unabhängigen pharmakologischen Effekte der NSAIDs erklären und neue therapeutische Möglichkeiten aufzeigen.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Materialien und Methoden	3
2.1 Xenopus laevis	3
2.1.1 Haltung und Fütterung der Frösche	4
2.1.2 Gewinnung der Oozyten	5
2.1.3 Die Oozyten	8
2.2 Das Zwei- Elektroden Voltage Clamp Modell	11
2.2.1 Setup	11
2.2.2 Ooclamp- Software	14
2.2.3 Versuchsdurchführung	15
2.3 Der LPA- Rezeptor	16
2.3.1 Allgemeines	16
2.3.2 Der Rezeptor- Aufbau	17
2.3.3 Die Signalübertragung	19
2.3.4 Die Modulation der intrazellulären Signalkaskade	21
2.3.5 Der Agonist	23
2.4 Statistik	27
2.4.1 Deskriptive Statistik	27
2.4.2 t- Test	27
2.4.3 Rangsummen- Test (Mann- Whitney)	28
2.4.4 Hill- Koeffizient	28
2.4.5 Power- und Fallzahlenberechnung	29
2.5 Lösungen und Medikamente	30
2.5.1 Standard- Lösungen	30
2.5.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika	31
2.5.3 LPA	34
2.5.4 Sonstige Lösungen und Materialien	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Die Wirkung von LPA ist konzentrationsabhängig	36
3.2 Inhibition des LPA-Effektes durch nichtsteroidale Antiphlogistika	39
3.2.1 Acetylsalicylsäure	39

3.2.2 Diclofenac	43
3.2.3 Reversibilität der NSAID-Wirkung	46
3.3 Die Identifikation des Wirkungsortes	48
3.3.1 Wirkung der NSAID auf Inositoltriphosphat	48
3.3.2 Wirkung der NSAID auf die Phospholipase C	50
3.3.3 Wirkung auf GTP γ S- ausgelöste Antworten	52
3.3.4 Wirkung auf durch Aluminiumfluorid- ausgelöste Antworten	53
4. Diskussion	56
4.1 Wahl der Methode	56
4.1.1 Nichtsteroidale Antiphlogistka	56
4.1.2 Lysophosphatidsäure	61
4.1.3 Die G- Protein- Kaskade	62
4.1.4 Die Oozyten des <i>Xenopus laevis</i>	63
4.1.5 Das Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Modell	64
4.2 Die Ergebnisse	66
4.2.1 Die NSAIDs beeinflussen die LPA- Funktion	66
4.2.2 Die Stoffwechsellkaskade	66
5. Zusammenfassung	75
6. Anhang	77
Abkürzungsverzeichnis	77
Abbildungsverzeichnis	79
Tabellenverzeichnis	80
Literaturverzeichnis	81
Genehmigung Bezirksregierung Münster	89
Lebenslauf	91
Eidesstattliche Erklärung	92
Danksagungen	93

1. Einleitung

In neuen Studien wird immer offensichtlicher, dass die Bandbreite der pharmakologischen Wirkungen von nichtsteroidalen Antiphlogistika (nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs) nicht allein auf die seit langem bekannte Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX) [69, 125] zurückgeführt werden kann.

Es wird vermutet, dass die Hemmung der Prostaglandinsynthese [125] zwar der Haupteffekt, aber nicht der einzige Effekt der NSAID- Wirkung ist.

Einige COX- unabhängige Wirkungen der NSAIDs wurden bereits beobachtet. Unter anderem gehört ein antagonistischer Effekt auf G- Proteine dazu [2, 5]. Angenommen werden Wechselwirkungen mit dem G- Protein [2, 5], die allerdings bisher nur in In-vitro-Studien mit [³⁵S]GTP γ S (Guadenosintrisphosphat) auf Membranen gereinigter Neutrophiler gezeigt wurden [1-4] und noch nicht an funktionsfähigen Zellen getestet und bewiesen worden sind.

Als zu untersuchender Rezeptor wurde der G- Protein- gekoppelte LPA- Rezeptor gewählt. LPA- Rezeptoren sind physiologischerweise auf den Oozyten des *Xenopus laevis* Krallenfrosches ausgebildet [40, 47], wodurch sich jegliche biotechnische Manipulationen an den Zellen erübrigen.

Lysophosphatidsäure ist eine in ihrer Wirkung gut untersuchte Substanz. Sie agiert als Mediator von Signalen, die sie über spezifische G- Protein- gekoppelte- LPA- Rezeptoren überträgt und so z.B. an Koagulation und Entzündungsvorgängen beteiligt ist.

80% aller bekannten Membran- Rezeptoren [13] sind G- Protein- gekoppelte Rezeptoren, GPCR [23, 93], weshalb Wechselwirkungen mit dem kleinen Molekül bereits große Auswirkungen haben können.

Mit der Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode [19, 84] wurde ein System gefunden, welches ermöglicht, die Pharmakologie des Rezeptors an funktionsfähigen Zellen zu untersuchen. Das Modell ist ein sensibles und etabliertes System zur

Darstellung von Membranpotentialen in großen Zellen, wie den Oozyten des *Xenopus laevis* Krallenfrosches. Es besteht zudem Möglichkeit, die dem zu untersuchenden Rezeptor nachgeschaltete Signalübertragungskaskade durch intrazelluläre Injektion bewährter Substanzen zu manipulieren [54, 76, 101].

Ziel dieser Studie ist es am Beispiel von Aspirin und Diclofenac, folgende Fragen zu beantworten:

1. Beeinflussen NSAIDs den LPA- Rezeptor?
2. Sind die Konzentrationen klinisch relevant?
3. Ist die Wirkung reversibel?
4. Welches ist der Wirkungsort der NSAIDs?
5. Wenn die NSAIDs auf G-Protein-Kaskade wirken, lässt sich der genaue Angriffsort innerhalb der Kaskade eingrenzen?

2. Materialien und Methoden

2.1 Xenopus laevis

Xenopus laevis, der afrikanische Krallenfrosch, gehört zu der Ordnung der Froschlurche in der Klasse der Lurche. Sie sind Bewohner südafrikanischer Süßwasserseen und zählen zu den Amphibien, die sekundär ins Wasser zurückgegangen sind. Die Atmung der Tiere erfolgt über die Lunge und in Anpassung an das Wasserleben zu 60% über die Haut. Über das Lungenvolumen stellt der Frosch seine Höhe im Wasser ein.

Die Frösche erreichen eine Größe von etwa 11- 13cm (ohne Hinterbeine). Der glatte Krallenfrosch hat einen flachen Kopf und einen stromlinienförmigen Körper. Die Rückenfarbe ist oliv- braun und der Bauch sowie die Innenseiten der Schenkel hell- beige mit zahlreichen unregelmäßig verteilten Pigmentierungen. Die wenig entwickelten Vorderbeine haben je vier lange Finger ohne Schwimmhäute. Die muskulösen Hinterbeine tragen je fünf Zehen. Die inneren drei Zehen besitzen schwarze Hornkrallen, die der Gattung ihren Namen geben. Zwischen den Zehen befinden sich große Schwimmhäute, die bis an die Zehenspitzen reichen. Diese Frösche sind hervorragende Schwimmer, die auch unter Wasser durch schnelles Rudern und Stoßen mit den Hinterbeinen erstaunliche Geschwindigkeiten erreichen können.

Sie können 20- 30 Jahre alt werden.

Seine Nahrung sucht der Krallenfrosch in den oberen Sedimentschichten des Gewässergrundes, welches er mit seinen Vorderarmen durchwühlt. Der *Xenopus laevis* besitzt weder Zunge noch Zähne und schaufelt die Nahrung mit den Vorderarmen in sein Maul.

Krallenfrösche besitzen am ganzen Körper ungefähr 200 Sinneszellen, die das Seitenlinienorgan bilden. Es sind „nahtähnliche“ Linien auf der Hautoberfläche des Frosches. Mit Hilfe dieses Organs registriert der Frosch, dessen Sehfähigkeit herabgesetzt ist, in seinem näheren Umfeld sowohl Wasserbewegungen als auch wasserchemische Veränderungen.

Die Frösche sind anpassungsfähig, relativ einfach zu halten und wenig krankheitsanfällig, weshalb sie schon lange zu Versuchszwecken, als auch zur

Diagnostik eingesetzt werden. Da die Haut der Tiere über einen natürlichen antibiotischen Schutz verfügt, sind Infektionen im Rahmen von Operationen selten.

Früher wurden die Frösche in der Schwangerschaftsdiagnostik verwendet. Hierzu wurde Urin von schwangeren Frauen in die Frösche injiziert. Waren diese schwanger, haben die Frösche nach wenigen Tagen gelaicht. Da meistens Apotheken diesen Test durchgeführt haben wurden die Frösche auch Apothekerfrösche genannt.

Abbildung 1

Xenopus laevis- Weibchen.



2.1.1 Haltung und Fütterung der Frösche

Die weiblichen Tiere werden in einer Kolonie von 6 Fröschen in einem handelsüblichen Hart- PVC Behälter [62] mit einem Fassungsvermögen von ca. 250l gehalten. Ein Entweichen der Tiere wird durch eine luftdurchlässige Abdeckung verhindert.

Eine per Zeitschaltuhr (Unitec, Type 46402; 63450 Hanau, Deutschland) gesteuerte Leuchtstoffröhre (Typ Multilux, Juwel Aquarium GmbH; 27356 Rotenburg/Wümme, Deutschland) übernimmt den normalen Tag- Nachtrhythmus. Um den nachtaktiven Tieren tagsüber die Möglichkeit eines Unterschlupfes zu gewähren, sind Dachziegel am Boden des ansonsten glatten Tanks platziert.

Der Tank ist mit Leitungswasser gefüllt, welches mit Aqua- Safe (43904 Melle, Deutschland) aufbereitet wird. Ein Ionenaustauscher (Cillit-Klarfilter 77SN; 69191 Schriesheim, Deutschland) verringert den Eisengehalt des Leitungswassers. Durch einen Außenfilter (Eheim Außenfilter, Typ 2224 010; 73779 Deizisau, Deutschland) wird das Wasser kontinuierlich gefiltert. Hierdurch entstehen eine gleichmäßige Luftzufuhr sowie eine ausreichende Zirkulation.

Einmal wöchentlich werden das Bassin und der Filter gesäubert und ein Drittel des Wassers wird durch frisches ersetzt. Der Tank mit den poikilothermen Lebewesen ist in einem auf 17 Grad Celsius klimatisierten Raum untergebracht, um auch im Sommer eine Wassertemperatur von 16-22°C zu gewährleisten.

Die Frösche werden zweimal wöchentlich mit etwa 3- 5g Futter (Tetra Cichlid- Sticks; 43904 Melle, Deutschland) pro Tier gefüttert. Das überschüssige Futter wird nach einigen Stunden abgesaugt.

Die Versuche wurden am 06.06.2000 durch das Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Münster unter dem Aktenzeichen A40/2000 genehmigt.

2.1.2 Gewinnung der Oozyten

Die Gewinnung der Oozyten verläuft in einer streng geregelten Reihenfolge, da einem Tier zwischen zwei Operationen eine Ruhepause von mindestens 2 Monaten eingeräumt werden muss [83]. Zwei Mal pro Woche werden frische Oozyten gewonnen. Bei jedem Eingriff wird die Operationsseite gewechselt.

Zum Zeitpunkt der Operation (OP) sollte das entsprechende Tier in einem tadellosen Gesundheitszustand sein.

Etwa vier Wochen vor der OP wird den Fröschen je 50 I.E. humanes Gonadotropin (From pregnant mare's serum, Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 30926 Seelze, Deutschland) in den lymphatischen Raum injiziert. Es dient der Beschleunigung der Follikelreifung in das Stadium IV und V nach Dumont [28] und der Ertragsoptimierung. Die Betäubung des Frosches erfolgt in einem separatem 25l- Aquarium, welches mit einer Methyl- 3- benzoat- Lösung (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, WA 17475; 30926 Seelze, Deutschland) gefüllt ist. Das Anästhetikum wird über die Haut des Tieres resorbiert. Durch das Zufügen von Eiswürfeln kann der Narkosevorgang stark

beschleunigt werden. Durch Reizung einer Zehe des Tieres wird die Wirksamkeit der Narkose nach 15min Inkubationszeit verifiziert.

Bei genügender Narkosetiefe wird das Tier, auf einem Eisbett auf dem Rücken liegend, unter einer Operationslampe gelagert. Der Operationsbereich – das untere laterale Abdomen– wird mit 70prozentigem Alkohol desinfiziert. Mit einem sterilen Skalpell wird ein diagonaler Schnitt von etwa 1cm Länge gesetzt. Es werden die Haut und die oberflächlichen Muskeln durchtrennt, um das Peritoneum darzustellen. Dieses wird mit einer Pinzette angehoben, um den Darm nicht zu verletzen und ebenfalls mit dem Skalpell durchtrennt. Die Oozyten liegen traubenförmig angeordnet direkt unter dem Peritoneum. Nun kann mühelos einen Teil der Oozyten abgetrennt werden. Der Rest der Oozyten wird einfach wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert. Das Peritoneum und die Dermis werden getrennt durch Einzelknopfnähte (Ethicon Vicryl 4-0) verschlossen. Die entnommenen Oozyten werden zunächst in Barth's Lösung aufbewahrt.

Nach dem Erwachen aus der Narkose wird der Frosch die folgenden 24 Stunden in einem separaten 25l- Becken mit frisch aufbereitetem Wasser gehalten, bevor er wieder zurück in die Kolonie gesetzt wird.

Bei entsprechender Pflege und guter Operationstechnik lassen sich die Tiere bis zu sechsmal operieren. Nach der letzten Operation müssen die Tiere getötet werden. Dazu werden sie noch vor Erwachen aus der Narkose in einen Gefrierschrank bei -80°C gelegt und nach 18 Stunden entsorgt.

Abbildung 2

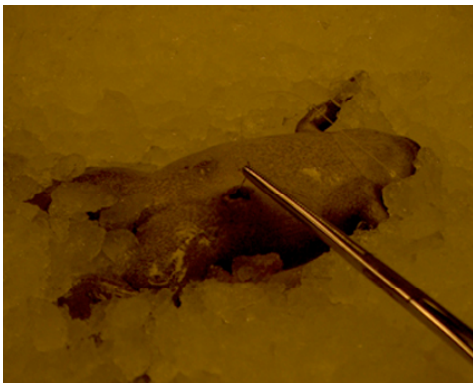
Oben links: Operation eines Frosches. Der Hautschnitt.

Oben rechts: Die zuentnehmenden Oozyten.

Mitte links: Die Hautnaht.

Mitte rechts: Operierter Frosch.

Unten links: In Eiswasser schwimmender Frosch.



2.1.3 Die Oozyten

Allgemeines

Die Eizellen von *Xenopus laevis* eignen sich ausgezeichnet zu Forschungszwecken. Ihre Größe von etwa 1- 2mm mit einem Gesamtvolumen von etwas mehr als 500nl und ihre Widerstandsfähigkeit erleichtern die Handhabung. Zudem besitzen die Oozyten nur wenige zelleigene Kanäle bzw. Rezeptoren [111] außer LPA- Rezeptoren [15, 78], wodurch die Untersuchung eines bestimmten isolierten Rezeptortyps möglich ist. An menschlichen Zellen wäre dies erschwert bzw. unmöglich, da zunächst eine Reihe von Kanälen und Rezeptoren geblockt werden müssten.

Seit es *Gurdon et al.* 1971 [49] gelang, durch Injektion von mRNA artfremde Proteine in den *Xenopus laevis* Oozyten zu exprimieren, spielen die Oozyten eine große Rolle bei elektrophysiologischen Untersuchungen von Membranproteinen. Insbesondere G-Protein- gekoppelte- Rezeptoren, die Identifizierung von Gensequenzen [50, 85] und die Kontrolle von Genen bei der DNA- Klonierung [118] stehen im Mittelpunkt des Interesses. Dies ist durch ihren gut ausgebildeten Translationsapparat [46, 60] möglich. Demnach können durch Injektion von mRNA oder DNA zellfremde Rezeptoren exprimiert werden und deren Aktivität untersucht [30, 31] sowie Messungen von Ionenströmungen [25, 26, 87] vorgenommen werden. Des Weiteren werden sie zur Klärung von Struktur- Funktionsbeziehung von Membranproteinen [114] benutzt.

Aufbau der Oozyten

Die verwendbaren Zellen befinden sich in den Reifestadien IV und V nach *Dumont* [28]. Sie können makroskopisch in zwei Hemisphären unterteilt werden: Eine dunkel pigmentierte Seite am animalen Pol und eine helle dotterreiche Seite am vegetativen Pol. Im Falle einer Befruchtung entwickelt sich aus dem, durch Melanineinlagerung dunkel gefärbten Pol der rostrale Teil und aus dem hellen Pol der kaudale Teil des Frosches.

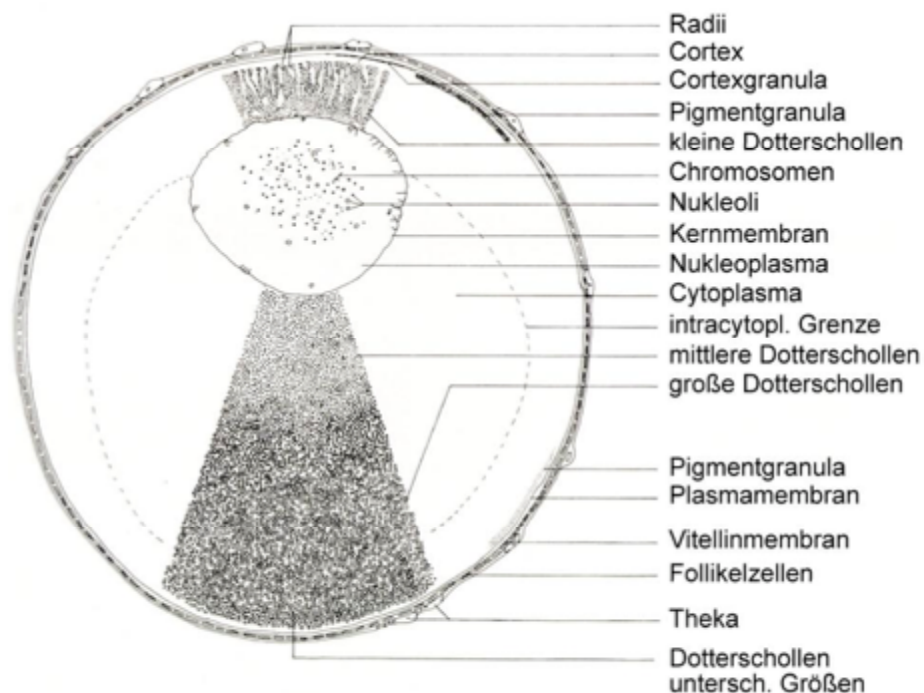
Die axiale Anordnung findet sich auch auf mikroskopischer Ebene [113]. Im Bereich des dunklen Pols befindet sich der haploide Zellkern, wobei auf der helleren Hemisphäre ein Großteil der Ribosomen und somit die zelluläre Ribonukleinsäure (RNA) zu finden ist.

Die Oozyte wird im frisch entnommenen Zustand durch verschiedene extrazelluläre Hüllen geschützt und stabilisiert [84, 111]. Es handelt sich – von innen nach außen – um folgende Strukturen: Plasmamembran mit Mikrovilli, glykoproteinreiche Vitellinhülle, Follikelzellschicht mit elektrischen und metabolischen Gap- junctions, und einer Theka interna und externa, bestehend aus kollagenem Bindegewebe, Fibroblasten, Nerven- und Gefäßzellen, sowie glatter Muskulatur [17, 91, 112]. Das einlagige Plattenepithel des inneren Ovariepithels stellt die äußere Hülle dar. Da diese schützenden Membranen die elektrophysiologischen Messungen und die Wirkung der Medikamente auf die Oozyte verändern können, werden sie durch Kollagenase entfernt [86, 88].

Abbildung 3

Schemazeichnung Oozytenaufbau.

Abbildung entnommen aus Hausen und Riebesell, 1991.



Präparation und Lagerung der Oozyten

Mittels Pinzette und Pipette wird versucht die traubenförmig zusammenhängenden Oozyten mechanisch voneinander zu lösen. Hierdurch hat die Kollagenase, die die Theka enzymatisch aufspalten soll, eine vergrößerte Angriffsfläche. 1mg/ ml Typ 1a Kollagenase (Clostridiopeptidase A; EC 3.4.24.3 von Clostridium histolyticum Boehringer Mannheim GmbH, 68298 Mannheim, Deutschland) wird in kalziumfreier OR2- Lösung gelöst. Die Oozyten werden in dieser Lösung zwei Stunden sanft durch einen IKA- Schüttler (Modell MTS 4, IKA Werke GmbH & Co. KG, 79219 Staufen, Deutschland) geschwenkt. Die Kalziumfreiheit bewirkt ein vorübergehendes Schrumpfen der Oozyten und die Membran löst sich leichter ab. Anschließend werden die Zellen viermal für etwa 10min mit der OR2- Lösung gespült, um sie von den Membran- und Kollagenaseresten zu säubern. Die fibröse Vitellinmembran, die den Oozyten ihre mechanische Stärke verleiht, bleibt hierbei erhalten.

Jetzt können die Zellen in einer Petrischale mit Barth's- Lösung gelagert und zu Versuchszwecken verwendet werden. In einem Raumlufinkubator (Typ LABO-100, Kirsch, 77608 Offenburg, Deutschland) bei 16- 18°C können die Oozyten mehrere Tage aufbewahrt werden.

Abbildung 4

Defollikulierte Zellen



2.2 Zwei- Electrode- Voltage- Clamp- Modell

Das Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Modell ist bestens geeignet Membranpotentiale in großen Zellen und Skelettmuskelzellen darzustellen [100] und spannungs- sowie ligandenabhängige Transmembrankanäle mit ihrem Signaltransduktionsmechanismus zu erforschen.

Mit dem Modell wird willkürlich das Membranpotential einer Zelle eingestellt, festgeklemmt. In den Membranen der *Xenopus laevis*- Oozyten befinden sich natürlicherweise calciumabhängige Chloridkanäle [15, 32]. Alle Vorgänge, die die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen, ändern somit auch den Chlorideinstrom, der Ladungsverluste ausgleicht. Mit diesem Setup wird die Änderung des Chlorideinstromes, also die zum Ausgleich des Ladungsverlustes benötigte Menge, erfasst.

2.2.1 Setup

Das Setup besteht aus einem Mikroskop (Stereo-Zoom 4, Leica, 64625 Bensheim, Deutschland), das ermöglicht die Arbeitsabläufe in einem kleinen Plexiglasbad zu beobachten. Neben dem Mikroskop befindet sich auf beiden Seiten jeweils eine Mikroelektrode, mit denen die Oozytenmembran penetriert wird und die in Elektrodenhalter (ESW-FxxV für die Spannungs- und E45W-FxxVH für die Stromelektrode; Warner Instrument Corporation, USA) eingespannt sind. Sie werden durch die Mikromanipulatoren MN-3333 der Firma Narishige (1 Plaza Rd. Greenvale, NY 11548, USA) bedient.

Die Mikroelektroden werden aus Silikatglaskapillaren (GC100FT-15, havard apparatus LTD, USA) mit einem Elektrodenpuller (Modell 773, Campden Instruments Limited, USA) hergestellt. Nach der Anfertigung sind die Spitzen der Elektroden noch verschlossen. Es muss ein möglichst kleines Stück abgebrochen werden, so dass eine Öffnung von ca. 10µm entsteht.

Die fertige Elektrode wird mit einer 3mol KCl- Lösung und einem Silberdraht (AGT10-W, Havard Apparatus LTD, USA) gefüllt.

Das Potential zwischen Lösung und Draht wird durch Chlorierung des Drahtes reduziert. Der Draht wird positiv geladen und hierzu in eine Lösung (0,9% NaCl oder 9M KCl) gehalten, die im Stromkreis integriert ist. Die Chlorionen wandern bei einem Strom von $1\text{mA}/\text{cm}^2$ zum Draht und bilden eine gleichmäßige Schicht.

Über die Silberdrähte steht die KCl-Lösung mit der Steuer- und Messeinheit in Verbindung [100].

Eine der beiden Elektroden dient als Spannungselektrode mit $R= 1- 2\text{M}\Omega$, misst also das Membranpotential. Die zweite ist die Stromelektrode mit $R= 0,5- 0,7\text{M}\Omega$, die die Ladungsdifferenz an die Zelle liefert und somit auf dem eingestellten Soll-Potential hält.

Um intrazelluläre Injektionen zu ermöglichen wird eine dritte Mikroelektrode, ebenfalls gehandhabt durch einen Mikromanipulator, am Setup installiert. Diese Mikroelektrode ist gefüllt mit dem jeweils zu injizierenden Wirkstoff, gelöst in einer 150mM KCl-Lösung und an einen automatischen Mikroinjektor (Nanoject, Drummond Scientific, Broomall, PA, USA) angeschlossen. Hierdurch ergibt sich die Gelegenheit, die intrazelluläre Signalkaskade direkt zu manipulieren und im Detail zu untersuchen.

Unter dem Mikroskop findet sich ein Plexiglasbad mit insgesamt drei Becken. Mittig ist das ca. 1ml fassende Hauptbecken, in dem die Versuche stattfinden. Das Becken verfügt über eine zentrale Vertiefung, in der die Zellen Halt haben und einer konstanten Strömung ausgesetzt sind.

Im rechten Nebenbecken befindet sich ein Zulauf für die Tyrodes- Lösung, während im linken Nebenbecken die Lösung über ein vakuumbetriebenes Pumpsystem (KNF Neuberger: Laboport, 79112 Freiburg, Deutschland) wieder abgesaugt und in zwischengeschaltete Flaschen geleitet wird. Der Flow wird auf 3ml/min eingestellt, wodurch applizierte Medikamente kontinuierlich ausgespült werden. Damit wird gewährleistet, dass die Agonisten für einen annähernd gleich bleibenden Zeitraum anfluten.

Im Bad sind zwei weitere Silberdrähte vorhanden, die weder untereinander noch zu der Zelle jegliche Verbindung haben und als Erdungselektrode bzw. als Bezugselektrode für die Spannungselektrode dienen. Zwischen letzteren kann nun das Ruhemembranpotential der geclampton Zelle bestimmt werden. Das

Ruhemembranpotential ist die Spannung, bei der der Ladungsaustausch über der Zellmembran in beide Richtungen gleich groß ist.

Da eine Wechselwirkung zwischen Ionenströmen und Membranpotential besteht, wird der Strom gemessen, der zur Aufrechterhaltung eines Membranpotentials von -70 mV benötigt wird [55]. Die Menge des zugeführten Stroms wird über eine Verschaltung zwischen Strom- und Bezugselektrode bestimmt.

Die Koordination der Konstanzhaltung des Membranpotentials und der Zufuhr des benötigten Stromes wird von dem Oocyte Clamp Amplifier OC-725C (Warner Instrument, Inc.; Hamden, CT 06514, USA) übernommen, mit dem die Elektroden verbunden sind. Die Informationen werden an einen IBM-kompatiblen PC weitergeleitet und dort mit entsprechender Software weiterverarbeitet.

Ein zwischengeschalteter Filter (WIC: LPF- 100B: Low Pass Bessel Filter, 4-Pole) unterdrückt durch Wechselströme entstandene Artefakte. Diesen durchläuft das Signal vor der Darstellung auf dem PC.

Ein Faraday'scher Käfig, der das gesamte Setup umgibt, sorgt dafür, dass der Einfluss möglicher Störströme gering bleibt.

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur, 25° Celsius, durchgeführt.

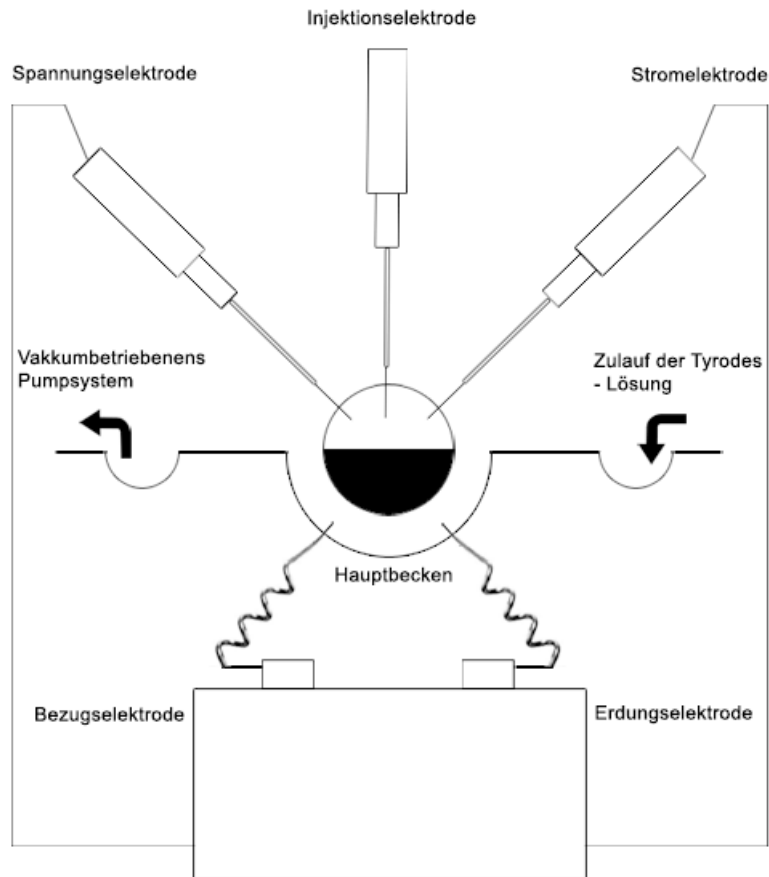
Abbildung 5

*Schemazeichnung des Setups mit einer im Hauptbecken liegenden Oozyte des *Xenopus laevis* Krallenfrosches. Ein Nebenbecken dient dem gleichmässigen Zulauf der Tyrodes-Lösung, das 2. dem Abfluss über ein vakuumbetriebenes Pumpsystem. Der Flow wird auf 3ml/min eingestellt, so wird ein kontinuierliches Abfluten der applizierten Medikamente gewährleistet.*

Im Hauptbecken befinden sich zwei Silberdrähte, die untereinander, aber auch zur Zelle keine Verbindung haben. Sie dienen als Bezugs bzw. Erdungselektrode für die Spannungselektrode. Zwischen der Bezugs- und der Spannungselektrode kann das Ruhemembranpotential der geclampten Zelle bestimmt werden.

Die Stromelektrode liefert die Ladungsdifferenz an die Zelle und hält sie somit auf dem eingestellten Soll-Potential.

Über die dritte, die Injektionselektrode können Wirkstoffe in die Zelle injiziert werden.



2.2.2 Ooclamp- Software

Die Auswertungssoftware zur Messung der Ströme muss bestimmte Anforderungen erfüllen: Da die Oozyten über ein großes Volumen, ca. 500nl, verfügen, und damit auch über große Membrankapazitäten, muss das Programm mit großen Strömen arbeiten können. Außerdem können sich rezeptorgesteuerte Potentialveränderungen im Gegensatz zu spannungs- und ligandengesteuerten Kanälen oft über Minuten hinziehen. Das Aufzeichnungsintervall muss also recht groß sein. In diesem Fall wird bei den Experimenten ein Zeitraum von 90sec – 5sec vor und 85sec – nach Applikation des Agonisten aufgezeichnet.

Beide Anforderungen werden in der Ooclamp- Software erfüllt. Zusätzlich wird das Signal bei einer Frequenz von 125Hz aufgezeichnet, wodurch die Störeinflüsse aus dem Stromnetz (50Hz) minimiert werden.

Das Programm beginnt unmittelbar nach dem Start des Versuches mit der Aufzeichnung der Messung, weshalb auf ein Oszilloskop verzichtet werden kann. Zellen, die schon das Ruhepotential nicht halten können, werden früh erkannt und können sofort verworfen werden.

Unkompliziert wird das Integral unter der Kurve als Maß für die Aktivierung der calciumabhängigen Chloridkanäle berechnet. Hierdurch lassen sich Aussagen über die Stimulierung der Rezeptoren treffen (Gesamtcalciumfreisetzung).

Die Daten werden mit der Ooclamp- Software lückenlos aufgezeichnet, gesichert und dokumentiert [29].

2.2.3 Die Versuchsdurchführung

Eine defollikulierte Zelle wird nun mit dem dunklen Pol nach oben in der Vertiefung des Hauptbades positioniert. An diesem Pol wird ihre Membran mit den beiden Mikroelektroden durchstoßen.

Das Programm der Ooclamp- Software zeigt unmittelbar nach Penetration der Membran die Ströme auf dem Bildschirm an. Das Membranpotential wird konstant bei -70mV gehalten. Die Zellen, die schon das Ruhemembranpotential nicht halten können, werden verworfen. Bei stabilen Zellen kann nun die Aufzeichnung gestartet werden.

Um die G- Protein- Kaskade zu manipulieren wird eine entsprechende Substanz intrazellulär injiziert.

Die Agonisten des zu untersuchenden Rezeptors werden mittels einer Pipette in einer bestimmten Menge (30µl) und Konzentration vorsichtig auf die Zelle appliziert.

Die Aufzeichnung wird automatisch nach 90sec beendet und kann bearbeitet und gespeichert werden.

2.3 Der LPA- Rezeptor

2.3.1 Allgemeines

Viele Informationsvorgänge in den Zellen von Lebewesen finden mit Hilfe von Rezeptoren statt. Rezeptoren können auf der Membran sitzen, intrazellulär liegen oder aber die gesamte Membran vollständig durchsetzen. Durch Bindung eines Agonisten ändern Rezeptoren ihre Konformation und lösen damit einen spezifischen Signalprozess aus.

Bei der Signalübertragung über transmembranöse Rezeptoren spielen G- Proteine häufig eine wesentliche Rolle. Sie können über die Bildung von Second- Messenger Enzyme in der Zelle aktivieren oder deaktivieren.

Lange war der Mechanismus, durch den der Agonist LPA wirkte, unsicher, jedoch unterstützten zahlreiche Hinweise die Beteiligung eines spezifischen G- Proteingekoppelten Rezeptors [94]. Die Suche nach einem spezifischen LPA- Rezeptor war, durch das Fehlen eines spezifischen Antagonisten, Schwierigkeiten bei ligandenbindenden Experimenten sowie durch das ubiquitäre Vorkommen von Zellen, die auf LPA reagierten, erschwert [21]. 1992 konnte van der Bend zum ersten Mal, nachdem viele der Wirkungsweisen von LPA schon bekannt waren, einen spezifischen LPA- Rezeptor identifizieren [124].

Mittlerweile weiß man, dass der LPA- Rezeptor einer großen Familie von G- Proteingekoppelten Rezeptoren angehört [23, 93].

Die Lysophospholipid GPCRs werden durch lp- (bzw. edg-/ vzg- u.v.m.) Gene codiert, von denen zur Zeit acht verschiedene Untertypen bekannt sind [23]. Drei dieser Gene, lp_{A1-3}, codieren den LPA- Rezeptor [6, 7, 9, 23, 36, 41, 53, 63]. Die restlichen fünf Gene codieren die Sphingosin- 1- Phosphat (S1P)- und Sphingosylphosphorylcholin (SPC)- Rezeptoren [8, 63, 77, 122, 129, 130].

Die dosisabhängige Aktivierung der Rezeptoren kann unterschiedliche Signalübertragungswege über die G- Proteine [41] in Gang setzen. Dazu gehört die MAP (mitogen- aktiviertes- protein)- kinase [9, 36], die Phospholipase C, Freisetzung

von Arachidonsäure und Hemmung von Adenylatcyclase [7, 65]. Außerdem kann sich die Aktivierung in morphologischen Zellveränderungen manifestieren [41, 53, 65].

Durch diese abweichenden Antworten der drei LPA- Rezeptoren auf denselben Agonisten kommt der Verdacht auf, dass es Unterschiede bei der G- Protein- Kopplung gibt. Und tatsächlich finden sich vier Klassen von heterotrimerischen G- Proteinen: G_s , $G_{i/o}$, $G_{12/13}$ und G_q [23], die unterschiedliche Reaktionen der Zelle hervorrufen.

An das G_s - Protein ist die Adenylatcyclase gekoppelt, die eine Bildung von cAMP aus ATP induziert. cAMP wirkt als intrazellulärer Botenstoff, der Kinasen via Phosphorylierung aktivieren bzw. deaktivieren kann. G_i inhibiert die Bildung von cAMP durch Reduktion der Funktion der Adenylzyklase [11, 80].

Ein weiterer gut bekannter Signalübertragungsweg ist die Phospholipase C (PLC), die über die Herstellung von Inositol- 1, 4, 5- trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) Signale weiterleitet [51, 89]. Er wird durch das G_q - Protein aktiviert.

Neben dem Vorkommen auf humanen Zellen ist der LPA- Rezeptor auch auf den Oozyten des *Xenopus laevis* physiologischerweise ausgebildet [40, 47]. Es ist ein G_q - Protein- gekoppelter Rezeptor [56, 57]. Seine Aktivierung löst calciumabhängige Chlorideinströme über der Zelle aus [32, 39, 40].

2.3.2 Der Rezeptor- Aufbau

LPA- Rezeptoren sind in die Membran integrierte Proteine. Sie sind durch Aminosäuresequenzen charakterisiert, die sieben hydrophobische Domänen von etwa 20- 25 Aminosäuren beinhalten. Diese sieben Sequenzen stellen den transmembranösen Anteil des Rezeptors dar. Man findet sie in einer Vielzahl von Organismen und sie übertragen, mit Hilfe von heterotrimerischen G- Proteinen, Signale in das Innere der Zelle.

Die transmembranösen Domänen formen α - Helices und bilden die Liganden-Bindungsstellen.

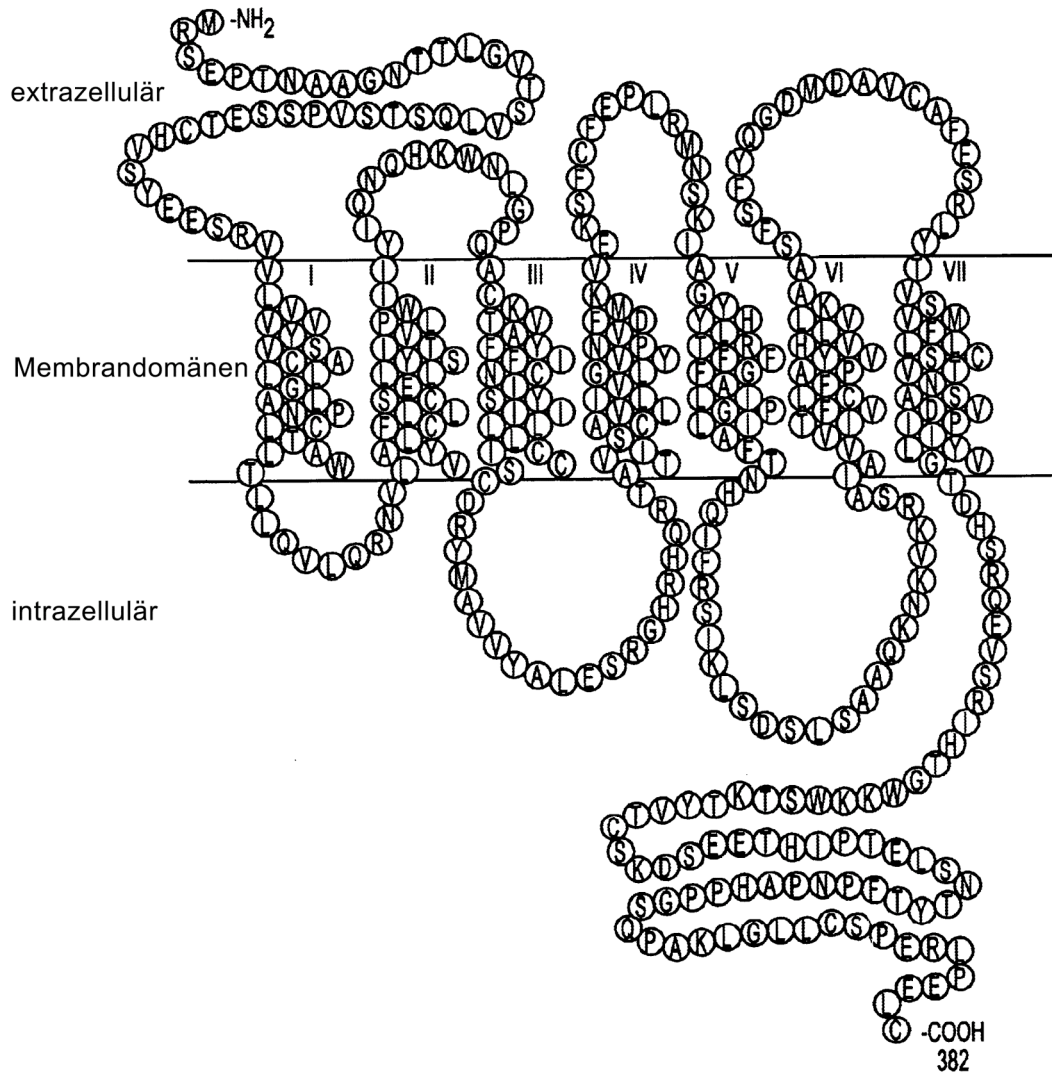
Extra- und Intrazellulär werden jeweils nochmals drei Schlaufen gebildet [74]. Der Amino- Terminus liegt extrazellulär, der Carboxy- Terminus liegt intrazellulär. Die

Enden können in ihrer Länge sehr unterschiedlich sein, im Durchschnitt liegen sie bei 10- 40 Aminosäuren.

Die Bindungsstelle für das G-Protein befindet sich intrazellulär zwischen der ersten und zweiten Transmembranregion [47].

Abbildung 6

Transmembranöser LPA- Rezeptor [23].



2.3.3 Die Signalübertragung

Der LPA- Rezeptor gehört zu den G- Protein- gekoppelten Rezeptoren.

Sobald der Agonist, LPA, an der Ligandenbindungsstelle des Rezeptors andockt, kommt es zu einer Konformationsveränderung des Rezeptors, so dass ein G- Protein gebunden werden kann.

G- Proteine, Guanin- Nucleotid- bindende Proteine, bestehen aus drei Komponenten: einer α -, β - und γ - Untereinheit. Die α - Untereinheit ist in der Lage, ein Guanin- Nucleotid, entweder GTP oder GDP, zu binden. Im Ruhezustand ist GDP (Guanin- diphosphat) gebunden.

Durch die Wechselwirkungen mit dem Rezeptor wird das G- Protein veranlasst das GDP gegen GTP auszutauschen. Hierdurch wird das G- Protein aktiviert und zerfällt in eine α - Einheit und eine $\beta\gamma$ - Einheit. Die α - Einheit bindet an ein Effektorprotein und ändert dessen Aktivität.

In unserem Fall handelt es sich bei dem Effektorprotein um das Enzym Phospholipase C. Dieses kann aus dem zweifach phosphoryliertem Membranlipid, Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) die Second- Messenger Inositol-1, 4, 5- trisphosphat und Diacylglycerol erzeugen.

Das lipophile DAG verbleibt in der Membran und aktiviert Protein- Kinasen vom Typ C. Diese Kinasen phosphorylieren in Gegenwart von Ca^{2+} Proteine und ändern dadurch deren Funktionszustand.

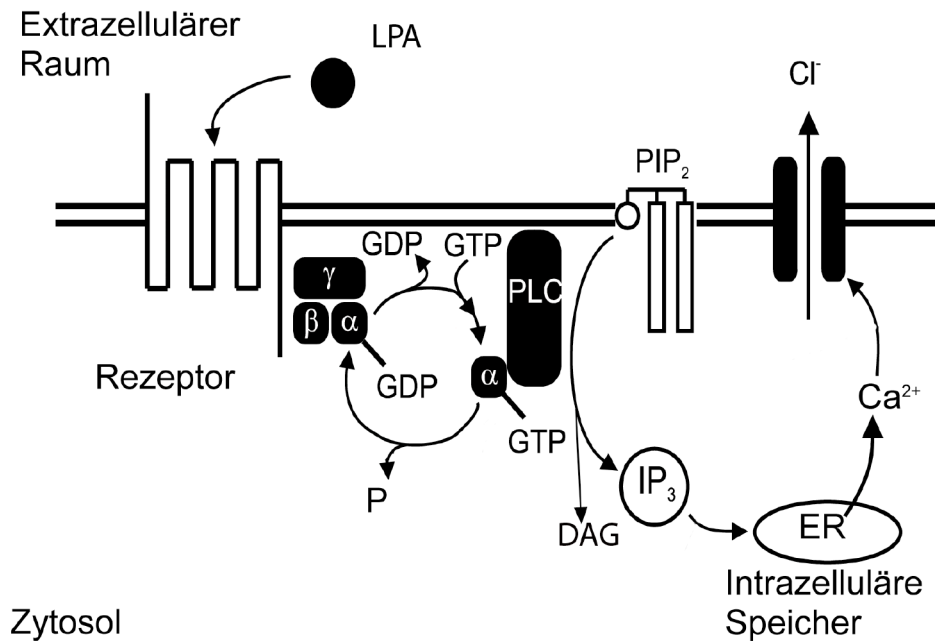
Das hydrophile IP₃ hingegen wandert zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und bewirkt dort eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus seinem Speicher. Normalerweise ist die Konzentration der Ca^{2+} - Ionen im Cytoplasma sehr gering. Sie liegt zwischen 10- 100nM und wird durch ATP- getriebene Ca^{2+} - Pumpen und $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ - Austauscher ständig niedrig gehalten. Die Ca^{2+} - Wirkung wird nun über spezielle Ca^{2+} - bindende- Proteine vermittelt. Hierzu gehört Calmodulin, welches durch Bindung von vier Ca^{2+} - Ionen zu einem Steuerungselement wird. Es tritt mit anderen Proteinen in Wechselwirkung und steuert so die Aktivität von Enzymen und Ionenkanälen [72].

In den *Xenopus laevis*- Oozyten wird über einen calciumabhängigen Chloridkanal ein vorübergehender Chlorideinstrom hervorgerufen [32, 39, 40].

Abbildung 7

Übertragungskaskade vom Andocken des Agonisten an den LPA- Rezeptor bis zum Öffnen des Chloridkanals.

Die Doppellinie präsentiert die Zellmembran. Der Agonist LPA bindet an den G- Protein gekoppelten Rezeptor. Das G- Protein aktiviert die Phospholipase C. Die Phospholipase C spaltet Inositoltrisphosphat vom Zellmembran-gebundenen Phosphatidylinositolbiphosphat ab. Inositoltrisphosphat aktiviert die IP_3 -sensitiven intrazellulären Speichern. Hieraus wird Calcium freigesetzt, welches wiederum Ca^{2+} -abhängige Chlorid- Kanäle in der Zellmembran aktiviert.



2.3.4 Die Modulation der intrazellulären Signalkaskade

Zur genaueren Erforschung der Signalkaskade wird die den G_q - Proteinen nachgeschaltete Signalkaskade durch verschiedene Stoffe manipuliert.

IP_3 setzt bei direkter intrazellulärer Injektion Calcium frei.

Heparin dient als spezifischer IP_3 - Rezeptorenblocker und unterbindet damit die Calciumfreisetzung fast vollständig.

$GTP\gamma S$ ist ein GTP Analogon. Allerdings ist die terminale Phosphatgruppe nicht abspaltbar, so dass durch $GTP\gamma S$ aktivierte G- Proteine die Phospholipase C irreversible in Gang bringen.

Aluminiumfluorid bildet mit GDP einen Komplex, der die Dissoziation des G- Proteins in seine Untereinheiten begünstigt und es dadurch aktiviert.

Geneticin (G418) wird in dieser Studie erstmals in Oozyten zur Modulation des Signalwegs verwendet. Es aktiviert die Phospholipase C allosterisch, wodurch Phosphatidylinositolbiphosphat in IP_3 und DAG aufgespalten wird und somit über das endoplasmatische Retikulum Calcium freigesetzt wird.

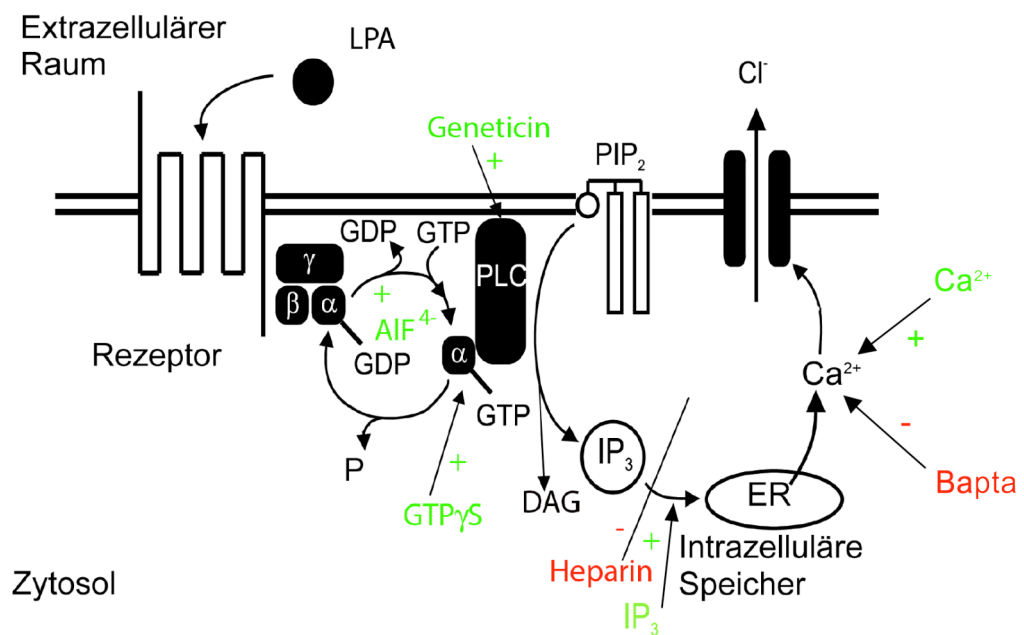
Durch Injektion dieser Stoffe wird jeder einzelne Übertragungsschritt in Abwesenheit und Gegenwart von NSAIDs untersucht, um somit den Wirkungsort einzugrenzen.

Abbildung 8

Manipulation der durch LPA in Gang gebrachten Signalkaskade.

$GTP\gamma S$ bindet an die α -Untereinheit des G-Proteins und aktiviert dadurch die PLC.

Heparin gilt als spezifischer IP_3 -Rezeptorenlocker und blockt die Kaskade somit an dieser Stelle. AlF^{4-} bildet mit dem GDP des G-Proteins einen Komplex, der die Dissoziation des G-Proteins in seine Untereinheiten begünstigt und dieses somit aktiviert. Geneticin aktiviert die Phospholipase C allosterisch und unterstützt damit die Aufspaltung von PIP_2 in IP_3 und DAG.



2.3.5 Der Agonist

Struktur der LPA

Lysophosphatsäure – LPA, 1- Acyl- 2- sn- Glycerol- 3- Phosphat – ist ein einfaches physiologisch vorkommendes Lysophospholipid. Es ist ursprünglich bekannt als ein Zwischenprodukt der de- novo- Biosynthese von Membranphospholipiden.

Trotz des ubiquitären Vorkommens und seiner physiologischen Bedeutung, ist relativ wenig über die biochemischen Eigenschaften von LPA bekannt.

LPA besteht aus einer Hydroxyl-, einer Phosphat- Hälfte sowie einer Alkylkette, wodurch es wesentlich wasserlöslicher ist als andere Langekettenlipide. Wegen dieser Hydrophilie muss LPA nach seiner Bildung nicht Membran- assoziiert bleiben.

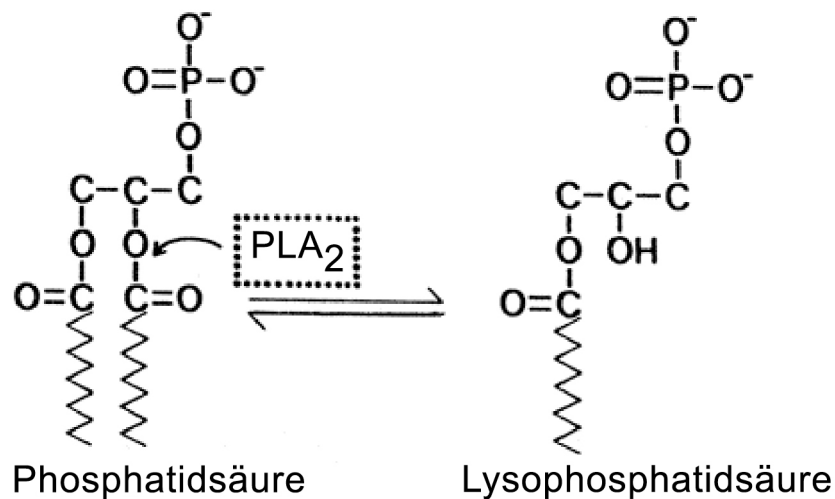
Die Länge und die Sättigung der Alkylkette sind variabel, weswegen man von einer Familie von Lysophosphatidsäuren sprechen muss [82]. Eine Veränderung an der Hydroxyl- oder Phosphatgruppe führt zu einer Inaktivierung. Durch Modifikation der Alkylketten wird lediglich die Wirksamkeit verändert [119, 120].

Die bekannteste Produktionsstätte bilden die durch Thrombin aktivierten Blutplättchen, die Thrombozyten.

Der größte Teil des LPAs wird durch Deacylierung aus neu gebildeter Phosphatsäure hergestellt. Die Deacylierung erfolgt durch Phospholipase A2. Der Produktion folgt die sofortige Freisetzung [92].

Abbildung 9

LPA- Herstellung aus neu gebildeter Phosphatidsäure in aktivierten Zellen durch Deacylierung durch PLA₂ [92].



Der Abbau von LPA erfolgt in intakten Zellen. In Fibroblasten wird LPA zu unterschiedlichen Teilen in Monoacylglycerol, Diacylglycerol und Phosphatidsäure hydrolysiert. Durch die enzymatische Zerlegung wird LPA inaktiviert und die Dauer und Stärke seiner Wirkung limitiert [92, 124].

In Gegenwart von Calciumionen fällt LPA in wässrigen Lösungen aus, was im Plasma durch seine Bindung an Albumin verhindert wird. Die biologischen Effekte von LPA hingegen sind nicht von der Bindung an Albumin abhängig [92].

Wirkungsweise

Mittlerweile wurde LPA auch als ein interzelluläres Signalüberträgermolekül entdeckt, welches spezifische Subtypen der G- Protein- gekoppelten Rezeptoren aktiviert und eine Reihe verschiedener biologischer und pathophysiologischer Antworten an einer Anzahl von Zelltypen hervorruft [92-94, 97].

LPA wird schnell durch aktivierte Zellen produziert und freigegeben, um die Zielzellen über die GPCR zu beeinflussen [23, 92, 93, 99].

Die Thrombozyten, als bekanntester Produktionsort, geben, je nach Aktivitätszustand, auf einen Entzündungsreiz hin ihr Produkt frei. Weiterhin wird es aber auch von verletzten Endothelzellen, Fibroblasten, Leukozyten und Tumorzellen freigesetzt [92, 127].

Das aus den Blutplättchen stammende LPA hat alle wichtigen Merkmale eines Mediators der Wundheilung und Geweberegeneration. Es ist ein autokriner Stimulus der Plättchenaggregation [23, 34, 75, 92, 93], des Fibroblastenwachstums [66, 92, 117, 123], der glatten Muskulatur von Gefäßen [93, 121] und der Keratinozytenproliferation durch Steigerung der Produktion von TGF- α und TGF- β [102]. Weiterhin fördert es die Zellfestigkeit [71], die Bindung von Fibronectin an die Zelloberfläche [129] sowie Neuritenretraktion [66, 117], welches ebenfalls wichtige Bestandteile der Wundheilung sind.

Da LPA ein Produkt des Blutkoagulationprozesses ist, befindet es sich natürlicherweise im Serum. Hier ist es in physiologisch relevanten Dosen, 2- 20 μ M, an Serumalbumin gebunden [34, 92, 93, 117].

Seit den anfänglichen Studien wird die Reaktion auf LPA an vielen verschiedenen Zelllinien getestet und nachgewiesen, wodurch die Liste der biologischen Wirkungen immer weiter wächst.

Es wurde gezeigt, dass LPA eine Rolle bei der Pathogenese von Atherosklerose und seine thrombotischen Komplikationen spielt, indem es sich in atherosklerotische Plaques anhäuft, wo es dann die Rolle des wichtigsten plättchenaktivierenden Lipids übernimmt [110].

Neben der wichtigen Rolle im Blutkoagulationsprozess spielt die Stimulation durch LPA auch eine Rolle bei Änderungen der Zellmorphologie [33, 66, 67, 105, 117], der Zellmotilität sowie der Einleitung Mitogenese über RAS, Tumorwachstum und die verstärkte Tumorzellinvasivität [20, 21, 93, 94].

Erhöhte Plasmaspiegel von LPA wurden bei Patientinnen mit Ovarialtumoren gefunden, weswegen LPA für einen möglichen Tumormarker im Frühstadium des Ovarialkrebs gehalten wird [35, 38]. Es kommt *in vitro* zu einer Zunahme der Zellproliferation in Ovarialkarzinomen und zu einer Veränderung der Apoptose-Rate durch LPA [61].

Diese zellulären Reaktionen auf LPA geschehen meist auf submolekularer Ebene [93].

Interessanterweise wird den NSAIDs eine Wirkung zugeschrieben, die den Effekten auf LPA entgegengesetzt ist.

2.4 Statistik

Die Daten werden mit Hilfe eines IBM- kompatiblen PC ausgewertet. Das Programm SigmaPlot 8.02 (SSPS Inc.; Chicaco, IL 60606, USA) dient zur Erfassung der Daten. Zur statistischen und graphischen Auswertung wird SigmaStat verwendet. Folgende Testverfahren werden angewandt:

2.4.1 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Untersuchung der Daten dient einer ersten Veranschaulichung der Daten, um zu sehen, ob es verschiedene Häufungen eines Merkmals zwischen der jeweiligen Bezugs- und Kontrollgruppen gibt. In unseren Versuchen richtet sich das Augenmerk auf die Menge an Ladung, die zur Aufrechterhaltung der Spannung über der Oozytenmembran notwendig ist.

Es werden der Mittelwert, der Median, die Standardabweichung und die Extremwerte der Variablen errechnet. Zeigen sich Unterschiede in den Mittelwerten, folgt eine Analyse hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p gleich bzw. kleiner 5% ($p \leq 0,05$).

2.4.2 t-Test

Der Student's t-Test ist ein parametrischer Test und setzt eine Normalverteilung voraus. Es gibt ihn für verbundene und unverbundene Stichproben.

Getestet wird, ob eine Differenz zwischen zwei Gruppen im Rahmen einer möglichen zufälligen Abweichung liegt, bezogen auf Mittelwert und Standardabweichung in einer normalverteilten Population. Es ist die Summe aller quadrierten Abweichungen der einzelnen Messwerte vom arithmetischen Mittel, dividiert durch die Anzahl der Messwerte.

Hier wird der t- Test für unverbundene Stichproben benutzt. Im Falle, dass die Parameter einer Gruppe nicht normalverteilt sind, wird der Rangsummentest verwendet.

2.4.3 Rangsummen-Test (Mann- Whitney)

Der Mann- Whitney- Wilcoxon Test ist ein nichtparametrischer Zweistichprobentest für unverbundene Stichproben mit stetigen Merkmalen. Er wird z.B. zum Vergleich von Kontroll- und Probandengruppen verwendet. Die Varianz des betrachteten Merkmals sollte in beiden Gruppen gleich verteilt sein. Der Test prüft, ob die Verteilung auch hinsichtlich der Lage übereinstimmt.

2.4.4 Hill- Koeffizient

Regressionsgleichungen beschreiben die stochastischen Zusammenhänge der Variablen. Man benötigt sie zu Merkmalsvorhersagen. In dieser Arbeit soll eine Beschreibung ermöglicht werden, die Auskunft über die Größe einer Antwort auf einen Agonisten oder eine zu untersuchende Substanz gibt. Dies ist mit Hilfe der Hill- Gleichung möglich, aus der eine Dosis-Wirkungskurve abgeleitet werden kann.

$$f(x) = y_{\min} + (y_{\max} - y_{\min}) \left(1 - \left[\frac{x}{x_{50} + x} \right]^n \right)$$

y_{\max} und y_{\min} stellen die minimal, bzw. die maximal erhaltene Antwort dar; n ist der Hill- Koeffizient und x_{50} ist der Punkt der halbmaximalen Antwort. Sind y_{\max} und y_{\min} bekannt und ist x_{50} abschätzbar, so kann mittels Näherung aus den Werten der Ordinaten und Abszissen der optimale Kurvenverlauf errechnet werden. Weiterhin ist der Hill- Koeffizient n ein Maß dafür, wie viele Liganden benötigt werden, um einen Rezeptor zu stimulieren. Er sollte einer ganzen Zahl entsprechen ($n = 1, 2, 3$ etc.).

Die Güte der Regressionsgleichung bezeichnet man als Fitting und wird durch den Korrelationskoeffizienten r ausgedrückt. R gibt an, wie stark die Punktwolke der Messwerte um die Regressionskurve streut. Sie wird als r^2 ausgedrückt. Idealerweise liegt dieser Wert bei + oder -1.

2.4.5 Power- und Fallzahlenberechnungen

Die Poweranalyse ermittelt prospektiv die minimale Zahl der Messungen, die erforderlich sind, um einer Differenz zweier Stichproben Signifikanz zu verleihen.

2.5 Lösungen und Medikament

2.5.1 Standard- Lösungen

Die Zubereitung der Lösungen erfolgt aus destilliertem Wasser und den in **Tabelle 1** angegebenen Chemikalien. Mit Hilfe eines Magnetrührers werden die Zutaten in einem Becherglas durchmischt. Der angegebene pH- Wert wurde durch Zugabe von konzentrierte NaOH, bzw. HCl- Lösung und unter Kontrolle eines pH- Meters (Knick Typ 507; 48249 Dülmen, Deutschland; pH- Elektrode: Schott Blueline 12pH; 55122 Mainz, Deutschland) eingestellt.

	Tyrodes	OR2	Barth
NaCl	150	82,5	88
KCl	5	2,0	1
MgCl₂	1	1,0	1
Hepes	10	5,0	15
Dextrose	10	-	-
CaCl₂	2	-	0,41
NaHCO₃	-	-	2,4
MgSO₄	1	-	0,82
Ca₂ NO₃	-	-	0,3
Gentamycin	-	-	0,1
pH	7,4	7,5	7,6

Tabelle 1 Zusammensetzung der Lösungen; alle Angaben in mM (außer der pH).

2.5.2 Nichtsteroidale Antiphlogistika

Acetylsalicylsäure

Acetylsalicylsäure (ASS) gehört zu den sauren antipyretisch wirkenden Analgetika.

Die Summenformel lautet $\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOCH}_3$.

Bei der Herstellung wird zunächst aus Phenol in einer Kolbe- Schmidt- Reaktion Kohlendioxid angelagert: Das Natriumion komplexiert zwischen der Hydroxygruppe des Phenols und dem durch die Reaktion negativ geladenen, einfach gebundenen Sauerstoff des Kohlendioxids und bewirkt ein selektives Dirigieren des Kohlendioxids in die ortho- Stellung. Damit entsteht die Salicylsäure. An die Salicylsäure wird mit Essigsäureanhydrid eine Acetylgruppe angelagert, es entsteht die Acetylsalicylsäure [70, 73].

ASS wird schnell und nahezu vollständig resorbiert.

Da ASS im sauren pH- Bereich des Magens überwiegend in nicht- dissoziierter, gut lipidlöslicher Form vorliegt, wird es zum Teil schon hier aufgenommen.

Nach Diffusion in die Schleimhautzellen dissoziiert sie entsprechend dem höheren intrazellulären pH (pKa der ASS: 3,8). So wird ein hoher Konzentrationgradient für die Diffusion aufrechterhalten. Die nun folgende Abdiffusion in das Interstitium und in die Kapillaren ist wegen der fehlenden Lipidlöslichkeit der dissoziierten Form langsamer, weswegen es zu einer Anreicherung in der Magenschleimhaut und den entsprechenden Nebenwirkungen kommt.

Nach der Resorption verteilen sich Salicylate schnell in alle Gewebe, besonders in Nieren, Leber, Lunge, Synovialflüssigkeit, Milch und Speichel.

Die Plasmaeiweißbindung erreicht 50- 80%.

Zwischen Hemmung der Prostaglandinsynthese überträgt die Acetylsalicylsäure einen Acetylrest auf das aktive Zentrum der Cyclooxygenase, die somit endgültig inaktiviert wird.

ASS wird durch Esterasen im Plasma und im Gewebe rasch (Halbwertszeit, HWZ, 15min) und fast vollständig in Salicylsäure (HWZ 2- 3h) und Acetat gespalten

(Deacetylierung). In der Leber erfolgt die kapazitätslimitierte Konjugation mit Glycin und Glucuronsäure. Letztendlich wird die Salicylsäure und ihre Metaboliten renal ausgeschieden. Die Ausscheidung ist vom Urin- pH abhängig.

In der Schmerztherapie ist die Anwendung von ASS keineswegs auf schwache Schmerzen beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf die initiale Schmerzbehandlung bei Tumor- Patienten, nach dem Stufenschema der WHO, und kann im akuten Migräneanfall intravenös (i.v.) werden.

Die Wirksamkeit der Substanz wird durch seinen Säurecharakter unterstützt. Die schwachen Säuren liegen in entzündetem Gewebe mit niedrigem pH zu großem Teil in nicht- dissoziierter Form vor und werden somit als lipophile Substanzen lokal angereichert.

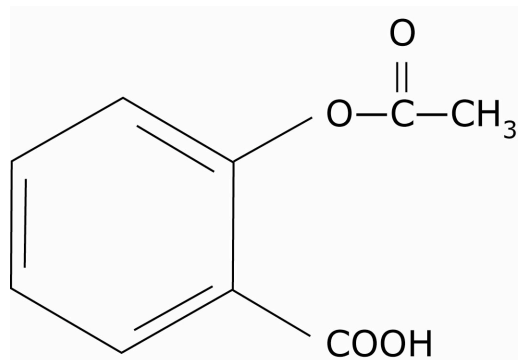
Die unerwünschten Wirkungen von ASS sind weitläufig. Sie reichen von subjektiven gastrointestinalen Störungen bis zu Magengeschwüren, welche unter intravenöser Gabe seltener beobachtet werden. Es kommt zu Störungen der Harnsäureausscheidungen – diese sind dosisabhängig–, „Aspirin- Asthma“, dem Reye- Syndrom bei Kindern, und bei Langzeitanwendung wirkt ASS auch nephrotoxisch.

Eine auch therapeutisch nutzbare Nebenwirkung stellt die Thrombozytenaggregationshemmung dar, die schon bei sehr niedrigen Dosen erzielt wird. Thrombozyten können keine Enzyme nachbilden und die Cyclooxygenase – wie oben beschrieben– wird irreversibel gehemmt, so dass die gerinnungshemmende Wirkung für den Rest des Lebens der Thrombozyten (durchschnittlich etwa 7- 10 Tage) anhält.

Aspirin[®], Acetylsalicylsäure (ASS), stammt von der Bayer AG, 51368 Leverkusen, Deutschland. ASS wird in den gewünschten Konzentrationen in Tyrodes gelöst.

Abbildung 10

Strukturformel der Acetylsalicylsäure.



Diclofenac

Diclofenac hat eine HWZ von ein bis zwei Stunden. Es wird vollständig hepatisch metabolisiert und vorwiegend renal eliminiert.

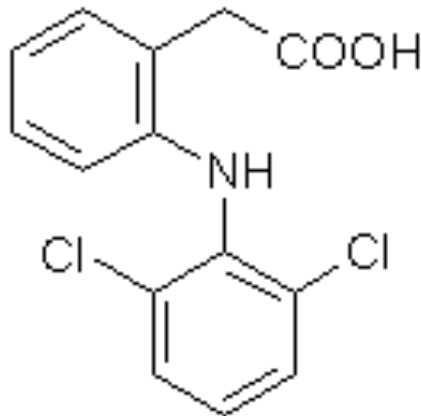
Diclofenac wird auch als unselektiver COX- Hemmer bezeichnet, da es besonders die Cyclooxygenase 2, COX- 2, hemmt.

Typische Anwendungsgebiete von Diclofenac sind Arthrose, rheumatoide Arthritis, Schwellungszustände nach Sportverletzung und Operationen, Rückenschmerzen und Bandscheibenvorfälle. Bei rheumatischen Erkrankungen wird heutzutage –wegen höherer Wirksamkeit gegenüber ASS– häufig Diclofenac eingesetzt. Der Einfluss von Diclofenac auf die Blutgerinnung ist jedoch vergleichsweise gering.

Diclofenac -2 - [(2,6-Dichlorophenyl)amino] benzeneacetic acid- (SACG, Steinheim, Deutschland) wird ebenfalls je nach gewünschter Konzentration in Tyrodes aufgelöst.

Abbildung 11

Strukturformel des Diclofenac.



2.5.3 LPA

Das verwendete LPA stammt von der Sigma Aldrich Chemie GmbH (SACG, 89552 Steinheim, Deutschland). Es liegt als Natriumsalz vor, das mit Chloroform in Lösung gebracht wird. Die Stammlösung weist eine Konzentration von 10^{-2} M auf. Das Chloroform wird vor Herstellung geringer konzentrierter Lösungen verdunstet, da seine Auswirkungen auf das Oozytenmodell nur schwer abschätzbar sind.

Physiologischerweise ist LPA an Plasmaproteine gebunden, die seine Lösung vermitteln. Hier wird LPA deswegen mit 0,1% Rinderalbumin (Bovines Serum Albumin- BSA fatty acid free; ICN Biomedicals; Costa Mesa, CA) in Tyrodes gelöst.

Um aus einem Mikroliter Stammlösung eine 10^{-3} molare Lösung herzustellen, werden 50 μ l bovines Serumalbumin (BSA) und 450 μ l Tyrodes hinzugefügt. Das BSA dient als Vehikel für LPA.

2.5.4 Sonstige Lösungen und Materialien

Alle Substanzen stammen von Sigma Aldrich (Laborchemikalien GmbH, 30926 Seelze, Deutschland). Sie wurden, soweit nicht extra aufgeführt, in 0,15M KCl- Lösung gelöst.

KCl- Lösung: Zur Herstellung von KCl- Lösung löst man 150mM in destilliertem Wasser auf.

Kollagenase- Lösung: Die Kollagenase- Lösung wird aus 1mg Kollagenase Typ A (Clostridiopeptidase A; EC3.4.24.3 von Clostridium hystolyticum der Boehringer Mannheim GmbH, 68298 Mannheim, Deutschland) auf 1ml OR2- Lösung hergestellt.

BSA: bovines Serumalbumin, als 1g Natriumsalz wird in 100ml Tyrodes gelöst.

GTP γ S: 3×10^{-8} l von 0,1M Guanosin 5'-O-(2-Thiophosphat).

Heparin: 5×10^{-8} l 2g/l Heparin (Glucosamin- N- sulfat, Glucosamin- O- sulfat, Glucuronsäure- O- sulfat- mucopolysaccharid, als Natriumsalz, 5000 i.U.).

EDTA: 5×10^{-8} l einer 10^{-2} M EDTA- Lösung (Ethyldiamintetraessigsäure).

NaF und AlCl₃: zur Herstellung von AlF⁴⁻ wurde in destilliertem Wasser gelöst.

IP₃: 3×10^{-8} l von 2×10^{-3} M D- myo- Inositol-1, 4, 5 (trisdihydrogenphosphat)-Phosphat.

CaCl₂: 5×10^{-8} l einer 10^{-4} M Calciumchlorid- Lösung.

3. Ergebnisse

3.1 Die Wirkung von LPA ist konzentrationsabhängig

Der G- Protein gekoppelte LPA- Rezeptor ist auf den *Xenopus laevis*- Oozyten physiologischerweise ausgebildet [40, 47].

LPA (1- Acyl- 2- sn- Glycerol 3- Phosphat) induziert in *Xenopus laevis* Oozyten vorübergehend einen Chloridstrom [97, 117]. Es handelt sich um einen Einstrom, der durch eine IP_3 vermittelte Calcium- Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum zustande kommt ($I_{Cl(Ca)}$), resultierend aus der Stimulation Gq- Protein gekoppelter Rezeptoren [29, 50].

30 μ l LPA werden über 1- 2sec der Oozyte zugeführt. Nach spätestens 3- 8sec wird in der Regel ein maximaler Strom mit Stärken von bis zu 2 μ A gemessen und aufgezeichnet. Innerhalb des Messintervalls, 85sec, kehrt das aufgezeichnete Signal wieder auf sein Ausgangsniveau zurück. Später auftretende kleine Stromspitzen und Fluktuationen werden durch in der Repolarisationsphase einströmendes extrazelluläres Calcium erklärt [25].

Diese Antwortkurve ist charakteristisch für den calciumabhängigen Chlorideinstrom $I_{Cl(Ca)}$ [29, 30, 50].

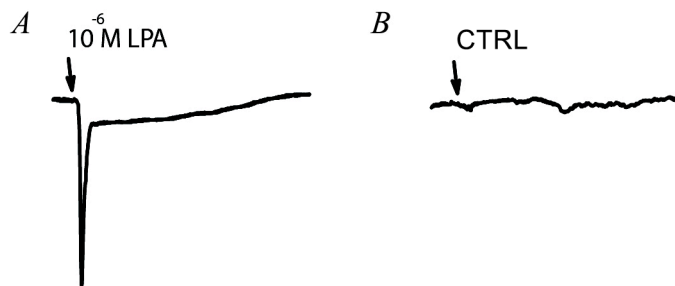
Eine Konzentration von 10^{-6} M LPA führt zu einer Ladungsverschiebung von 8,14 μ C.

Die Trägerlösung besteht aus Tyrode's und BSA (bovines Serumalbumin). BSA dient dem LPA, wie auch unter physiologischen Bedingungen [34, 92, 93, 117], als Trägersubstanz. Bei alleiniger Injektion von BSA auf eine Oozyte zeigten sich keine Änderungen des Ruhepotentials. BSA hat demnach keinen Einfluss auf den $I_{Cl(Ca)}$.

Abbildung 12

A Chlorideinstrom nach Applikation von 30nl 10^{-6} M LPA über zwei Sekunden. Der Pfeil markiert die LPA- Applikation. Die Ladungverschiebung betrug $8,14\mu\text{C}$.

B Kurve nach Applikation von 30nl Trägerlösung aus Tyrode's und 0,1% fatty acid free BSA über zwei Sekunden. Es kommt zu keinem Chlorideinstrom.



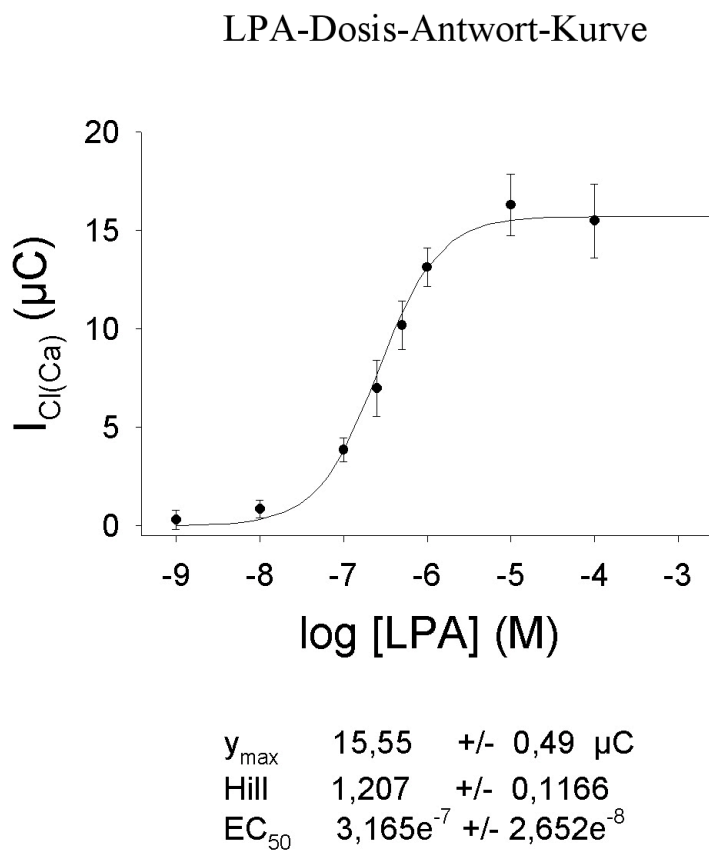
Der Effekt von LPA auf die Zellen ist konzentrationsabhängig. Messungen mit Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-3} M ergaben konzentrationsabhängig ansteigende Mittelwerte. Es wurden jeweils mindestens 7 Messwerte für eine Beobachtungseinheit herangezogen.

Zur Beschreibung der Zusammenhänge der Agonistenmenge und der Ladungverschiebung erfolgt mit Hilfe der Hill- Gleichung die Erstellung einer Dosis-Antwortkurve. Hierdurch wurde der EC_{50} , die Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt vorliegt, ermittelt.

Der EC_{50} für LPA liegt bei $3,16 \pm 0,26 \times 10^{-7}$ M bei einem Hill- Koeffizienten von $1,21 \pm 0,12$. Maximale $I_{Cl(Ca)}$ ($15,55 \pm 0,49 \mu\text{C}$) wurden durch LPA 10^{-4} M induziert.

Abbildung 13

LPA aktiviert den endogenen LPA- Rezeptor in *Xenopus laevis* Oozyten konzentrationsabhängig. Maximale $I_{Cl(Ca)}$ durch LPA $10^{-4}M$ LPA (y_{max}) waren $15,55 \pm 0,49 \mu C$. Als Konzentration mit dem halbmaximalen Effekt (EC_{50}) wurde, passend zur unten gezeigten Kurve mit der Hill- Gleichung, $3,16 \pm 0,26 \times 10^{-7}M$ berechnet. Der Hill-Koeffizient lag bei $1,21 \pm 0,12$. $n \geq 7$ für jeden Datenpunkt.



3.2 Inhibition des LPA-Effektes durch nichtsteroidale Antiphlogistika

3.2.1 Acetylsalicylsäure

Um den Effekt von ASS auf die Signaltransduktion zu ermitteln wurden Oozyten bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Tyrode's mit ASS inkubiert. Im Anschluß wurde die Stromkurve unter der Zugabe von 30nl 10^{-6} M LPA abwechselnd im Vergleich zu in reiner Tyrode's Lösung gebadeten Oozyten aufgezeichnet und ausgewertet.

Da auch bei der Hemmung durch ASS ein konzentrationsabhängiger Effekt vermutet wurde, wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-3} M) ASS hergestellt.

Während der nachfolgenden Messung, bei der 1μ M LPA appliziert wurde, konnte eine deutliche Reduktion des $I_{Cl(Ca)}$ beobachtet werden. Bei der höchsten ASS-Konzentration wurde eine Verringerung des Stromes auf 21,8 % im Vergleich zu Kontrollzellen des gleichen Tages beobachtet.

Die Hemmung durch ASS erwies sich als konzentrationsabhängig.

Die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) berechnet durch die Hill-Gleichung liegt bei $9,6\pm 4,6 \times 10^{-7}$ M, bei einem Hill- Koeffizienten von $0,72\pm 0,24$. Der maximale Einstrom $I_{Cl(Ca)}$ liegt bei $15,97\pm 1,50\mu$ C (Tabelle 2).

Interessanterweise deckt sich der IC_{50} mit der klinisch benutzten Konzentration von ASS [22, 42].

Abbildung 14

Lysophosphatsäure- Signal induziert durch $1\mu\text{M}$ LPA in Kontrollzellen und in Oozyten, die zehn Minuten in Acetylsalicylsäure bei Konzentrationen von 10^{-9} - 10^{-3}M inkubiert waren.

Der Pfeil markiert die LPA- Applikation. Der Strom wurde integriert und als Ladungsbewegung beschrieben. ASS 10^{-6}M = $11,0\ \mu\text{C}$; ASS 10^{-3}M = $3,1\ \mu\text{C}$.

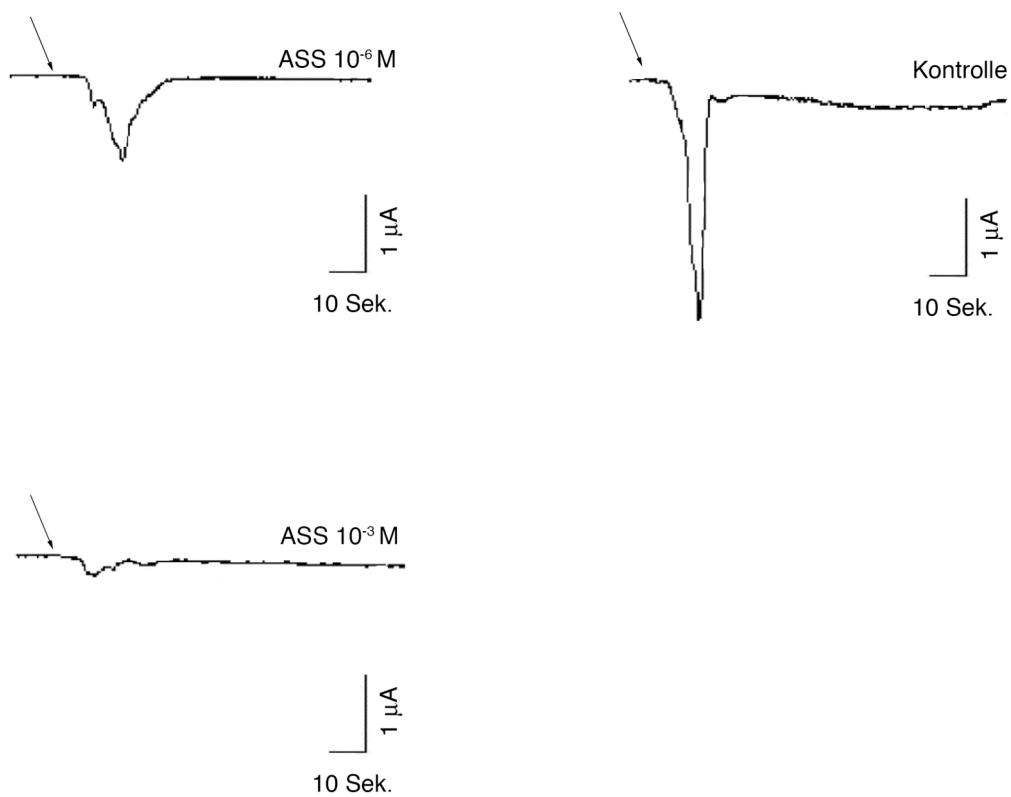


Abbildung 15

ASS inhibiert das LPA- Rezeptor- Signal in einer konzentrationsabhängigen Weise.

Siehe auch Abbildung 16, Dosis- Inhibitionskurve von Acetylsalicylsäure.

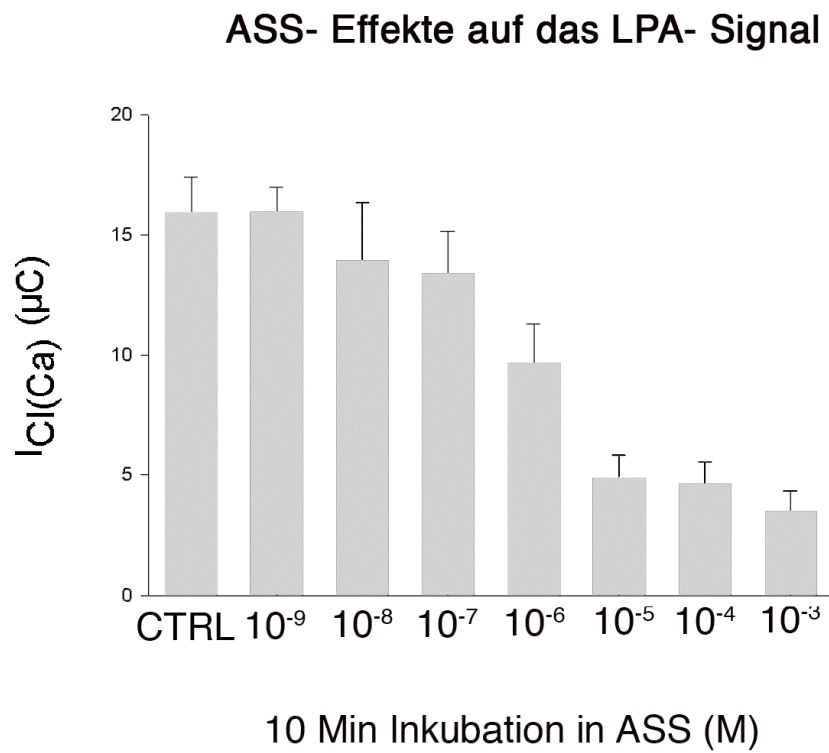
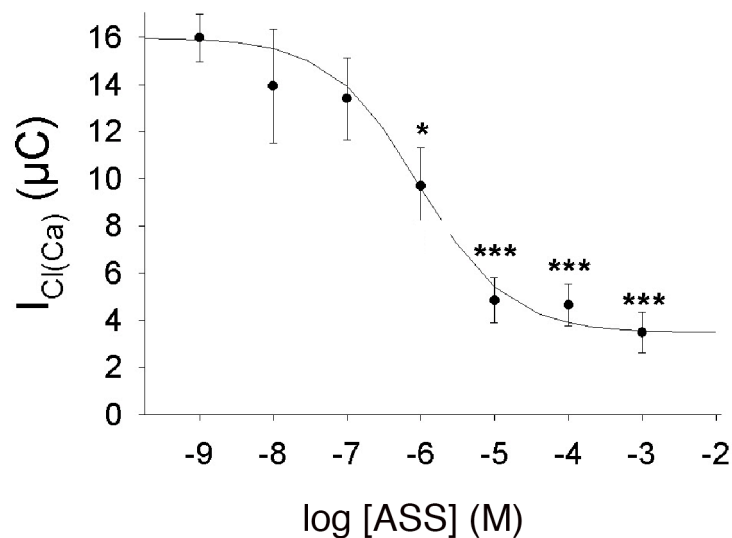


Abbildung 16

Die Dosis- Inhibitionskurve von ASS auf LPA 10^{-6} M. Kurvenanpassung nach Hill-Gleichung ergab eine halbmaximale Hemmkonzentration von $9,6 \pm 4,6 \times 10^{-7}$ M. und einen Hill-koeffizienten von 0,72. $n \geq 7$ für jeden Datenpunkt. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, statistische Signifikanz nach Student's t- Test) Kontroll- $I_{Cl(Ca)}$ ist $15,91 \pm 1,50 \mu C$. (Balkendiagramm Abbildung 15)

Dosis-Inhibitionskurve von Acetylsalicylsäure auf LPA 10^{-6} M



Hill = 0,72 +/- 0,24
IC₅₀ (M) = $9,6e^{-7}$ +/- $4,6e^{-7}$
y_{max} (μC) = 15,27 +/- 0,80

3.2.2 Diclofenac

Ebenso wie für ASS wurden für Diclofenac Lösungen mit Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-3} M hergestellt, in denen die Oozyten für etwa 10 min inkubiert wurden.

Nach Applikation von $1\mu\text{M}$ LPA kann auch in diesem Fall eine Reduktion der Chlorideinwärtsströme $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ auf 15,2 % festgestellt werden.

Die Hemmung des Stroms ist auch hier konzentrationsabhängig. Der IC_{50} beträgt $1,9 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M bei einem Hill Koeffizienten von $0,56 \pm 0,11$. Der größte Einstrom $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ lag bei $23,58 \pm 1,56\mu\text{C}$ (Tabelle 2).

Und ebenso wie bei Acetylsalicylsäure liegt der IC_{50} von Diclofenac im klinisch relevanten Bereich.

Abbildung 17

Lysophosphatsäure- Signal induziert durch $1\mu\text{M}$ LPA in Kontrollzellen und in Oozyten, die zehn Minuten in Diclofenac inkubiert waren.

Der Pfeil markiert die LPA- Applikation.

Der Strom wurde integriert und als Ladungsbewegung beschrieben. Diclofenac $1\text{mM} = 4,52\mu\text{C}$.

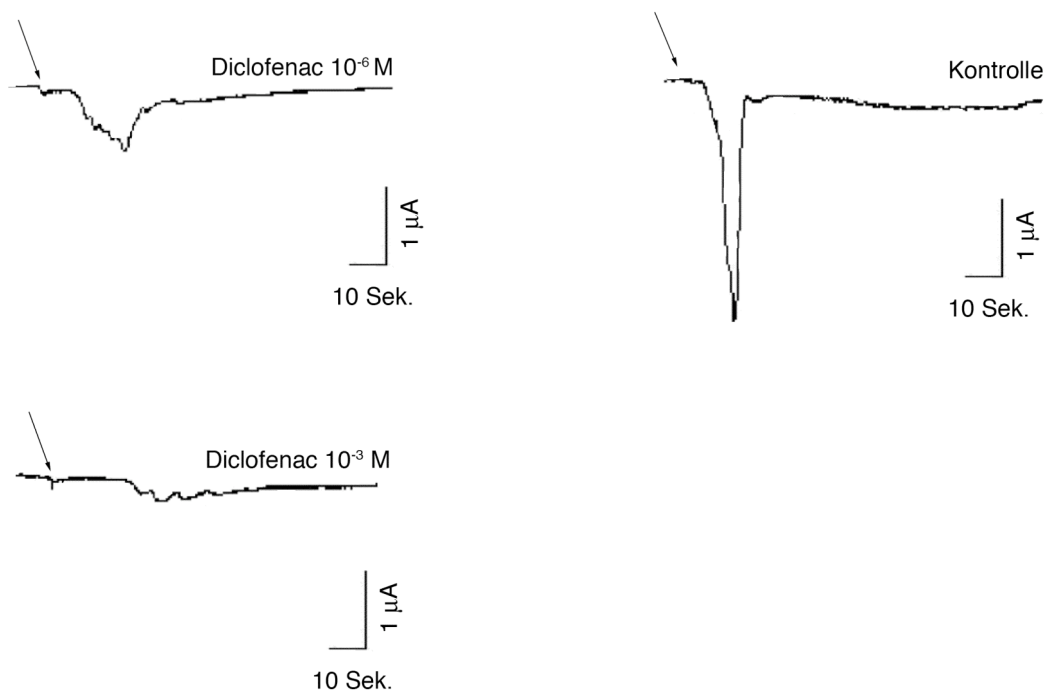


Abbildung 18

Diclofenac inhibiert das LPA- Rezeptor- Signal in einer konzentrationsabhängigen Weise. Siehe Abbildung 19, Dosis- Inhibitionskurve von Diclofenac.

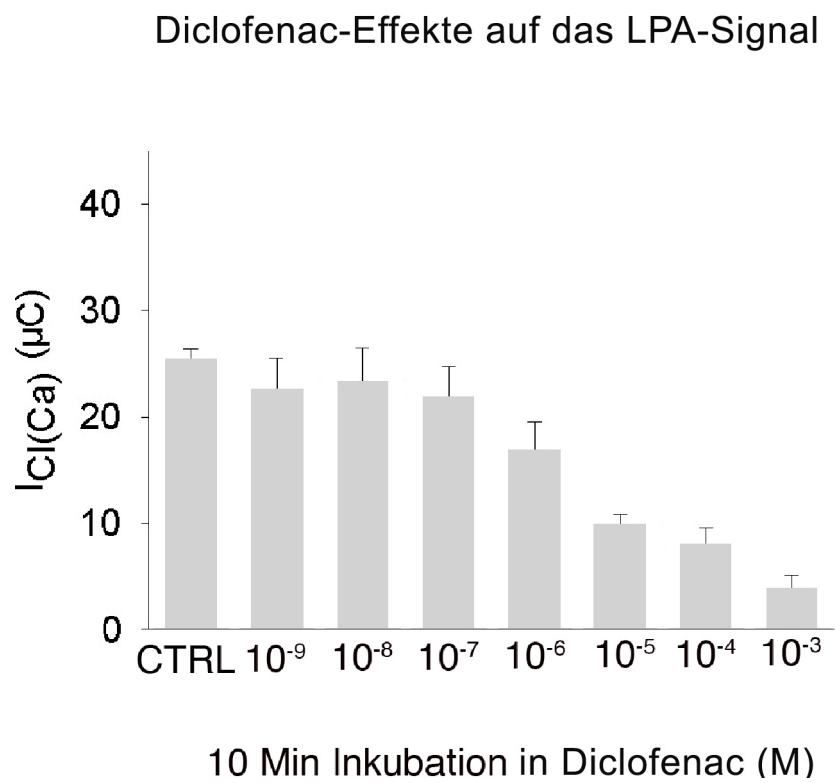
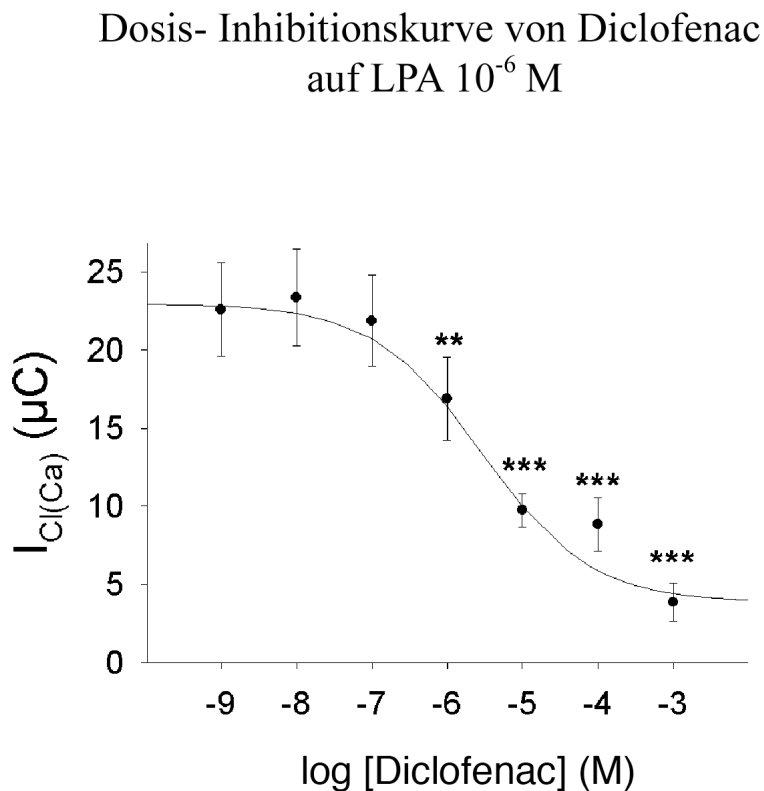


Abbildung 19

Die Dosis- Inhibitionskurve von Diclofenac auf LPA 10^{-6} M. Kurvenanpassung nach Hill- Gleichung ergab eine halbmaximale Hemmkonzentration von $1,9 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M und einen Hill- Koeffizienten von 0,56. $n \geq 7$ für jeden Datenpunkt. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, statistische Signifikanz nach Student's t- Test) Kontroll- $I_{Cl(Ca)}$ ist $25,43 \pm 0,96 \mu C$. (Balkendiagramm Abbildung 18)



Hill = $0,56 \pm 0,11$
 IC_{50} (M) = $1,90 \pm 0,7 \times 10^{-6}$
 y_{max} (μC) = $23,58 \pm 1,56$

Tabelle 2 ASS und Diclofenac, IC₅₀ – Werte.

NSAIDs	IC ₅₀ (M)	Hill- Koeffizient	E _{max} (μC)	R ²
ASS	9.6 ± 3.6 x 10 ⁻⁷	0.72 ± 0.24	15.97 ± 1.50 (p=0,98)	0.98
Diclofenac	1.9 ± 0.7 x 10 ⁻⁶	0.56 ± 0.11	23.58 ± 1.56 (p=0,46)	0.98

3.2.3 Reversibilität der NSAID- Wirkung

Um zu zeigen, dass die Hemmung durch die NSAIDs reversibel ist, wurden die Oozyten zehn Minuten in den jeweiligen Lösungen inkubiert. Die Ströme sind daraufhin im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant verringert ($p < 0,001$). Nach einer zweistündigen Erholungszeit in Barth's solution, konnte eine komplette Wiederherstellung der Rezeptorfunktion beobachtet werden. Die Auswirkungen der NSAIDs sind somit nicht Ausdruck einer irreversiblen, toxischen Schädigung an der Zellmembran oder an den Zellorganellen.

Abbildung 20

zeigt die Reversibilität der Inhibition von ASS und Diclofenac auf die LPA- Antwort.

(A) mit 1mM ASS

(B) mit 1mM Diclofenac

Der erste Balken zeigt Kontrollantworten auf LPA. Durchschnittliche Antwort in den Kontrollgruppen: 28,16 ± 1,21 μC bzw. 21,19 ± 2,10 μC, n= 11 und n= 15.

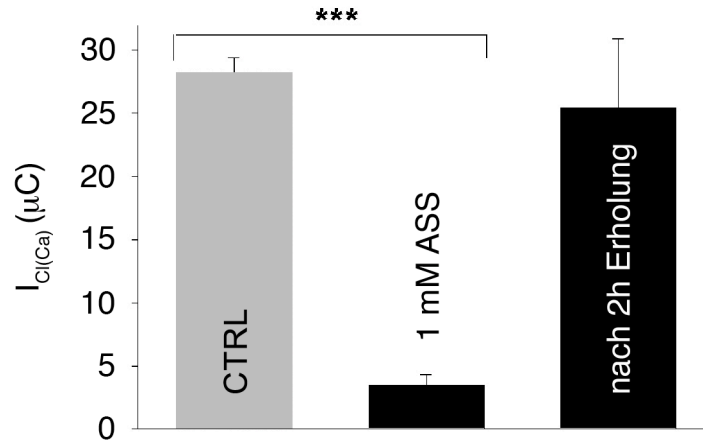
Der zweite Balken zeigt die Inhibition der LPA- Antwort durch die jeweiligen NSAIDs.

*Beide NSAIDs (1 mM Lösung) inhibieren den LPA- induzierten I_{Cl(Ca)} (Ströme reduziert auf (A) 3,47 ± 0,86 μC bzw. (B) 3,86 ± 1,22 μC, n ≥ 7) signifikant (***) $p < 0,001$).*

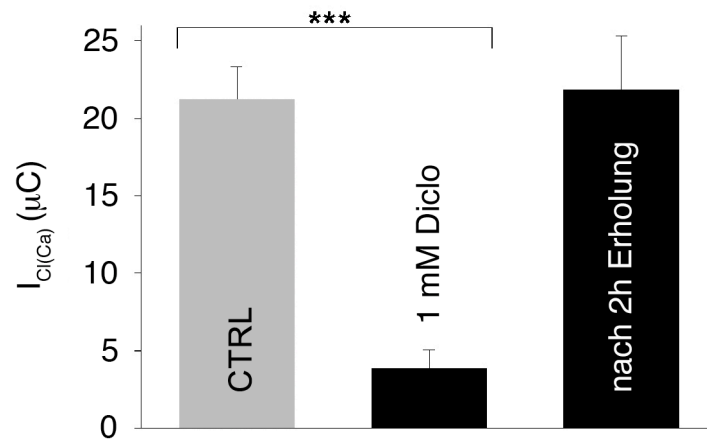
Zur Prüfungen der Reversibilität, wie auf Balken 3 gezeigt, wurden die Oozyten 30 Minuten in eine NSAID- Lösung und hinterher zwei Stunden in eine normale Barth- Lösung gelegt. Die Barth- Lösung wurde alle 30 Minuten ausgewechselt.

Nach der 2- stündigen Erholungsphase wurden Oozyten mit $10^{-6}M$ LPA injiziert. $I_{Cl(Ca)}$, $n \geq 7$.

(A) CTRL $25,47 \pm 5,47 \mu C$; $3,76 \mu C$ (1mM ASS); $24,9 \mu C$ (Erholung)



(B) CTRL $21,82 \pm 3,46 \mu C$; $4,76 \mu C$ (1mM Diclofenac); $22,2 \mu C$ (Erholung)



3.3 Identifikation des Wirkungsortes von NSAIDs

3.3.1 Wirkung der NSAID auf Inositoltriphosphat

IP₃ setzt, durch Stimulation eines spezifischen Rezeptors auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums, Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle frei.

Durch Injektion von 50,60nL einer 2mM IP₃- Lösung wurden, wie in verschiedenen Artikeln bereits berichtet [58, 115], Membranströme ähnlich denen, die bei Rezeptorstimulation ausgelöst werden, hervorgerufen.

Heparin blockiert selektiv endogene IP₃- Rezeptoren[97, 101].

Um zu zeigen, dass das IP₃ auch wirklich Bestandteil der Stoffwechselkaskade ist, die durch LPA in Gang gesetzt wird, wurde 50nl niedermolekulares Heparin in einer Konzentration von 2ng/nl in die Zelle injiziert. Nach zehnminütiger Inkubation konnte Zugabe von LPA nur noch sehr schwache Antworten auslösen.

KCl, als Trägelösung des IP₃, vermochte keine Ströme auszulösen.

Hieraus ist zu schließen, dass die Antwort von Ca²⁺ abhängig ist und hauptsächlich durch Ca²⁺- Ausschüttung aus den IP₃- abhängigen Speichern des endoplasmatischen Retikulums erfolgt.

Nachdem die Zellen zehn Minuten in Aspirin inkubiert waren, zeigte sich bei Injektion von IP₃ keine signifikante Änderung der Membranströme.

Die durchschnittliche Antwort der Kontrollzellen lag bei 12,26± 1,39µC. Durch IP₃ ausgelöste Antworten von in ASS inkubierten Zellen betragen 9,59± 2,95µC.

Die Ströme der in Diclofenac inkubierten Zellen ergaben Werte um 12,48± 2,08µC und waren damit ebenfalls nicht signifikant verändert.

Abbildung 21

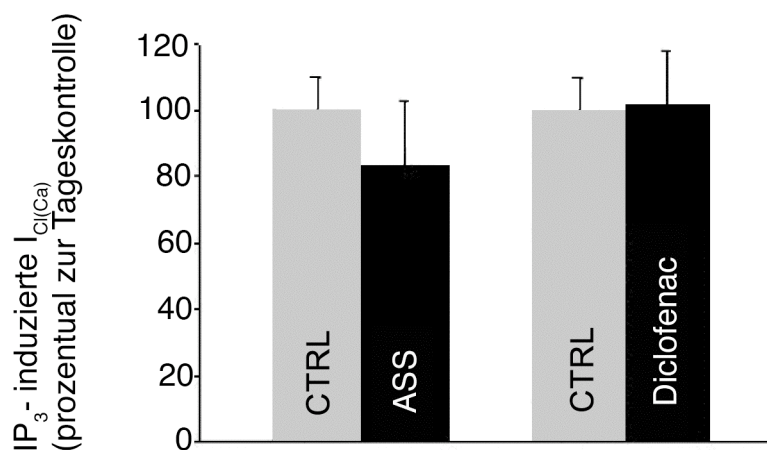
Balkendiagramm zur Inhibition von IP_3 - induzierten $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.

Unter Umgehung des G- Protein- Rezeptor wurden die intrazellulären Calcium-Speicher im endoplasmatischen Retikulum direkt durch intrazelluläre Mikroinjektion von 50,60nL IP_3 (2mM) in beide Gruppen, Kontroll- und Untersuchungsgruppe, aktiviert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zuvor zehn Minuten in den jeweiligen NSAID-Lösungen inkubiert.

Die Kontrollgruppe (graue Balken) zeichnet sich durch unbehandelte Zellen, die lediglich durch intrazelluläre Injektion der unterschiedlichen Stoffe (IP_3 , Phospholipase C, $GTP\gamma S$, Aluminiumfluorid), gelöst in 150mM KCl, stimuliert wurden aus ($n \geq 8$).

Die Antwort der Kontrollzellen ($12,26 \pm 1,39 \mu C$) wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die schwarzen Balken zeigen die prozentualen Antwortströme von mit ASS ($9,59 \pm 2,95 \mu C$) bzw. Diclofenac ($12,48 \pm 2,08 \mu C$) behandelten Oozyten die bei 78,22% bzw. 101,79% der Kontrollantworten lagen und damit keine signifikante Hemmung zeigten.



3.3.2 Wirkung der NSAID auf die Phospholipase C

Phosphatidylinositolspezifische- Phospholipase C (PI-PLC oder PLC β) spaltet Phosphatidylinositolbiphosphate (PIP₂) in Inositoltriphosphat und Diacylglycerol (DAG) (*Abbildung 11*).

Wie bei Morris et al. beschrieben aktiviert das Aminoglycosid Geneticin (G418) PI-PLC allosterisch [95]. Bisher wurden weder Geneticin noch ein anderer PI-PLC-Aktivator in dem *Xenopus laevis*-Modell angewendet.

Durch Injektion 50,6nL einer 0,3mM G418- Lösung in die Oozyten konnten Antwortströme I_{Cl(Ca)} von 4,58 \pm 0,76 μ C in den Kontrollzellen aufgezeichnet werden.

Auch diesmal wurde um zu zeigen, dass die durch Geneticin- induzierten Ströme dem physiologischen Weg folgten, wurden die Zellen mit 25 ng Heparin (Heparin blockiert selektiv endogene IP₃- Rezeptoren [97, 101], s.o.) injiziert. Zehn Minuten nach der Injektion konnten durch LPA- Zugabe nur geringe Antwortströme in den Zellen ausgelöst werden. Es wurde eine signifikante Antwortreduktion auf nur 15% der Kontrollzellantwort (0,67 \pm 0,27 μ C) beobachtet.

Daraus lässt sich schließen, dass die intrazelluläre Ca²⁺- Freisetzung, die durch G418 induziert wurde, über IP₃ übertragen wurde.

Nach Inkubation in der jeweiligen NSAID- Lösung wurde nun Geneticin injiziert.

Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in den durch Geneticin- induzierten Antworten mit oder ohne Behandlung durch Aspirin (4,13 \pm 0,82 μ C) erkennen.

Derselbe Versuch mit in Diclofenac inkubierten Oozyten erbrachte Werte von 3,22 \pm 0,54 μ C und damit gleichermaßen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Der Angriffspunkt muss dementsprechend vor der Phospholipase C in der Kaskade liegen, z.B. am G- Protein.

Abbildung 22

Balkendiagramm zur Inhibition Geneticin (G418)- induzierter $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.

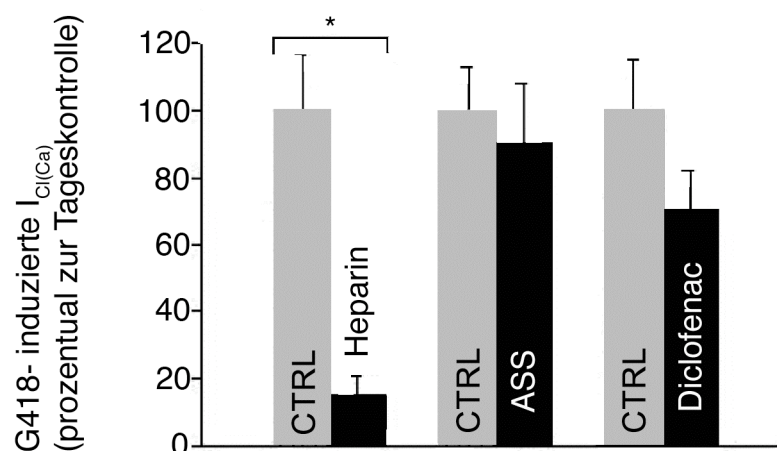
Unter Umgehung des G- Protein- Rezeptors wurde die Phospholipase C direkt durch intrazelluläre Mikroinjektion von 50,60nL Geneticin (G418; 0,3mM) in beide Gruppen, Kontroll- und Untersuchungsgruppe aktiviert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zuvor zehn Minuten in den jeweiligen NSAID-Lösungen inkubiert.

Die Kontrollgruppe (graue Balken) zeichnet sich durch unbehandelte Zellen, die lediglich durch intrazelluläre Injektion der unterschiedlichen Stoffe, gelöst in 150mM KCl, stimuliert wurden aus ($n \geq 8$).

Die Antwort der Kontrollzellen ($4,58 \pm 0,76 \mu C$) wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die schwarzen Balken zeigen die prozentualen Antwortströme von ASS ($4,13 \pm 0,82 \mu C$) bzw. Diclofenac ($3,22 \pm 0,54 \mu C$), die bei 90,17% bzw. 70,31% der Kontrollantworten lagen und damit keine signifikante Hemmung zeigten.

Das erste Balkenpaar zeigt, dass Heparin, ein IP_3 - Rezeptor- Antagonist, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die Signalkaskade, die durch Geneticin induziert wurde signifikant auf nur 14,63 % hemmt. Somit wurde gezeigt, dass die Geneticin-induzierten Antwortströme dem physiologischen Signalübertragungsweg folgen.



3.3.3 Wirkung auf GTP γ S- ausgelöste Antworten

Um den Signalweg nach der Phospholipase C zu prüfen, wurden die G- Proteine durch intrazelluläre Injektion von GTP γ S aktiviert. Dies ist ein nicht- hydrolysierbares GTP- Analogon. Es kann nicht durch die intrinsische GTPase- Aktivität der α - Untereinheit des G- Proteins dephosphoryliert werden [115]. Das G- Protein wird somit irreversibel aktiviert und damit die Phospholipase C in Gang gesetzt.

Wie auch schon zuvor wurden die Zellen zehn Minuten in ASS inkubiert. Nachfolgend wurde 50,6nl von 100mM GTP γ S in die Zellen injiziert und diese in Bezug zur Kontrolle gesetzt.

Es zeigte sich hierbei eine signifikante Reduktion der durch GTP γ S- induzierten Ströme gegenüber den Kontrollzellen auf 41 %.

Die Messungen der in Diclofenac inkubierten Zellen ergaben ebenfalls einen signifikanten Unterschied. Hierbei zeigte sich eine Reduktion der Ströme auf 46 %.

Abbildung 23

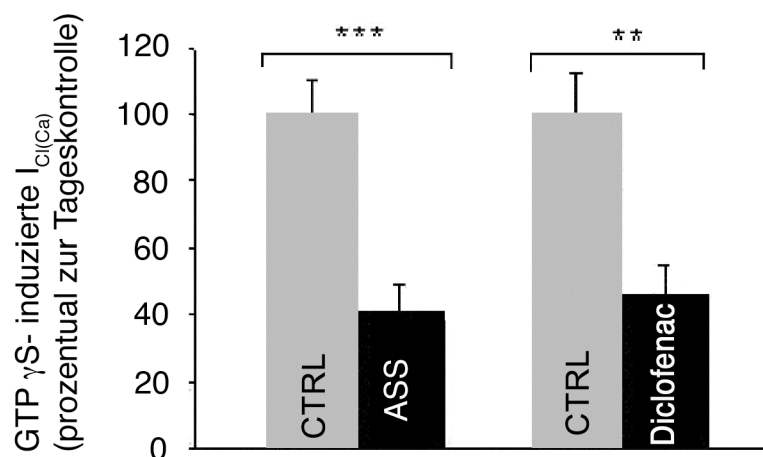
Balkendiagramm zur Inhibition GTP γ S- induzierter $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.

Unter Umgehung des G-Protein- Rezeptors wurde das G-Protein direkt durch intrazelluläre Mikroinjektion von 50,60nL GTP γ S (100mM) in beide Gruppen, Kontroll- und Untersuchungsgruppe aktiviert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zuvor zehn Minuten in den jeweiligen NSAID- Lösungen inkubiert.

Die Kontrollgruppe (graue Balken) zeichnet sich durch unbehandelte Zellen, die lediglich durch intrazelluläre Injektion der unterschiedlichen Stoffe, gelöst in 150mM KCl, stimuliert wurden aus ($n \geq 8$).

*Die Antwort der Kontrollzellen (μ C) wurde gleich 100% Prozent gesetzt. Die schwarzen Balken zeigen die prozentualen Antwortströme von ASS (μ C) bzw. Diclofenac (μ C), die mit einer Reduktion der Antworten auf 41% bzw. 46% der Kontrollen eine signifikante Hemmung zeigten, ** $p < 0,01$ bzw. *** $p < 0,001$.*



3.3.4 Wirkung auf durch Aluminiumfluorid- ausgelöste Antworten

Wie an den oben beschriebenen Versuchen mit GTP γ S gezeigt, wechselwirken die NSAIDs mit dem G- Protein. Da es verschiedene Möglichkeiten zur Inhibition an dem G- Protein gibt, wurden diese durch einen Versuch mit einem weiteren G- Protein-Aktivator, nämlich Aluminiumfluorid (AlF $^{4-}$), eingeschränkt.

AlF $^{4-}$ bindet an das GDP des G- Proteins und bildet einen AlF $^{4-}$ - GDP- Komplex. Dieser Komplex unterstützt die Dissoziation des heterotrimerischen G- Proteins in seine α - und $\beta\gamma$ - Untereinheiten, was automatisch zur Aktivierung des G- Proteins zur Folge hat [43]. AlF $^{4-}$ ist somit nicht abhängig von GTP bei der Aktivierung des G- Proteins. Dieser Versuch wurde schon vorher in *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt und hat Antwortströme ausgelöst [10, 109]. Es wurden 30nl einer Lösung injiziert, die 10mM Natriumfluorid und 30 μ M Aluminiumchlorid enthielt, wie bereits in früheren Studien verwendet.

Die Kontrollzellen antworteten auf die intrazelluläre Injektion von AlF $^{4-}$ mit durchschnittlichen Strömen von etwa $0,62 \pm 0,16 \mu C$. Vergleichbare Ergebnisse sind in den obengenannten Studien beschrieben.

Nach zehnminütiger Inkubation in der ASS- Lösung wurde ein Strom von etwa $1,13 \pm 0,63 \mu\text{C}$ beobachtet. Es besteht kein signifikanter Unterschied zu dem Ergebnis der Kontrollzellen.

Auch die in Diclofenac- Lösung inkubierten Zellen ergaben mit Strömen von $0,58 \pm 0,14 \mu\text{C}$ keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen.

Abbildung 24

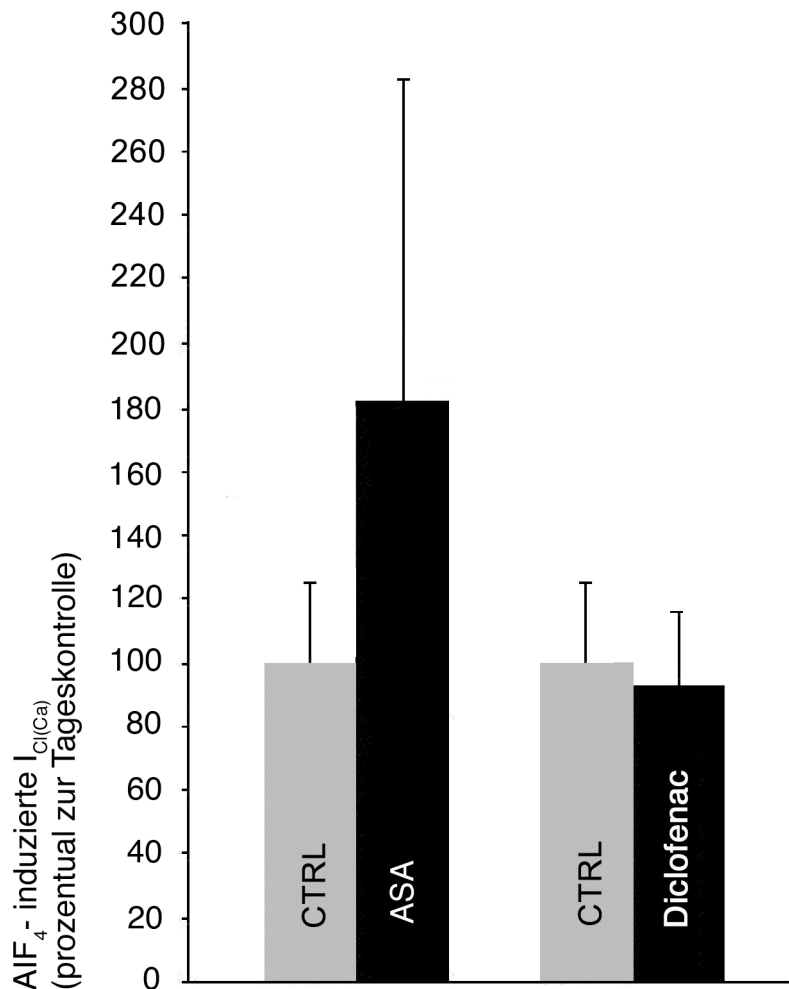
Balkendiagramm zur Inhibition AlF_4^- - induzierter $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ durch NSAIDs in Prozent.

Unter Umgehung des G- Protein- Rezeptors wurde das G- Protein direkt durch einen AlF_4^- - GDP- Komplex aktiviert. Der Komplex bildete sich nach intrazelluläre Mikroinjektion von 30nL einer Lösung mit 10mM Natriumfluorid und 30 μM Aluminiumchlorid in beide Gruppen, Kontroll- und Untersuchungsgruppe.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zuvor zehn Minuten in den jeweiligen NSAID- Lösungen inkubiert.

Die Kontrollgruppe (graue Balken) zeichnet sich durch unbehandelte Zellen, die lediglich durch intrazelluläre Injektion der unterschiedlichen Stoffe, gelöst in 150mM KCl, stimuliert wurden aus ($n \geq 8$).

Die Antwort der Kontrollzellen ($0,62 \pm 0,16 \mu\text{C}$) wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die schwarzen Balken zeigen die prozentualen Antwortströme von ASS ($1,13 \pm 0,63 \mu\text{C}$) bzw. Diclofenac ($0,58 \pm 0,14 \mu\text{C}$), die bei 182,26% bzw. 93,55% der Kontrollantworten lagen und damit keine signifikante Hemmung zeigten.



Wie oben bereits beschrieben bindet Aluminiumfluorid nach Injektion an das G-Protein. Es bildet einen Komplex mit dem GDP, welcher die Phospholipase C unabhängig von GTP aktiviert.

Im Unterschied dazu ist GTP γ S ein nicht hydrolysierbares Analogon von GTP und macht das aktivierte G- Protein resistent gegen die GTPase, aktiviert es somit irreversibel.

Hiermit kann der Wirkort beider NSAIDs in der Signalkaskade also weiter eingrenzt werden: die GTP- bindende Seite des G- Proteins oder der Rezeptor selbst, z.B. auf der intrazellulären Seite.

4. Diskussion

4.1 Die Wahl der Methode

4.1.1 Nichtsteroidale Antiphlogistika

Allgemeines

Schon im 3. Jahrhundert berichtete *Hippokrates*, dass das Kauen von Weidenblättern eine schmerzstillende Wirkung habe. Als erster Wirkstoff wurde 1828 von dem Pharmazeuten *Buchner* Salicin aus einem gereinigten Extrakt der Rinde der Salweide (*Salix alba*) isoliert und als fiebersenkendes Mittel empfohlen. 1839 wurde Salicylsäure als Bestandteil von Salicin durch *Piria* nachgewiesen und 1859 zum ersten Mal durch *Kolbe* vollsynthetisch hergestellt. 1876 führte *Stricker* Natriumsalicylat als Antipyretikum und Antirheumatikum an der Charité in Berlin ein. *Ebstein* und *Müller* beschrieben im gleichen Jahr die blutzuckersenkende und urikosurische Wirkung von Salicylsäure, wodurch sie sich auch zur Therapie von Diabetes mellitus und Gicht empfahl.

Aufgrund der schlechten Magenverträglichkeit (Übelkeit, Blutungen) und des bitteren Geschmacks von Salicylsäure wurde bald versucht, durch chemische Veränderungen des Moleküls die Wirkungsstärke zu erhöhen und dadurch die erforderliche Dosierung zu verringern. 1897 gelang es *Felix Hoffmann* erstmals, durch Anlagerung einer Acetylgruppe, Acetylsalicylsäure (ASS) in chemisch reiner Form herzustellen und die Nebenwirkungen zu verringern.

1899 wurde Aspirin[®] zum Patent angemeldet und entwickelte sich zu einem äußerst populären Präparat zur Behandlung von Fieber und entzündlichen Schmerzzuständen, obwohl die Wirkungsmechanismen bis dahin gänzlich unbekannt waren.

Nach dem Ersten Weltkrieg wurde Bayer[®] im Rahmen des Versailler Vertrags gezwungen, das Patent und die Rechte an der Marke Aspirin[®] für das Gebiet der Siegermächte USA, Frankreich und Großbritannien aufzugeben. Fortan vertrieben es auch amerikanische Pharmaunternehmen unter gleichem Handelsnamen, ohne Gebühren dafür zu entrichten. Bayer[®] hat das Markenrecht für die USA 1994 von

Sterling Drug zurückgekauft, die es seit 1918 hielten.

Die systematische Suche in Tierversuchen nach entzündungs- und schmerzhemmenden Pharmaka in den 60er- 80er Jahren führte zur Entwicklung einer Reihe von antiphlogistisch, analgetischen Säuren.

Erst 1971 postulierte *Sir John Vane* einen Wirkmechanismus von Acetylsalicylsäure und ASS- ähnlichen Medikamenten, der eine Erklärung der beobachteten, vielfältigen klinischen Wirkungen der Substanzen bot: Die Hemmung der Prostaglandinsynthese [70, 73, 125].

Die Wirkungsmechanismen der NSAIDs

Acetylsalicylsäure und Diclofenac, die in dieser Studie untersuchten Substanzen, werden unter der Bezeichnung nichtsteroidale Antiphlogistika (nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) zusammengefasst. NSAIDs sind Hemmstoffe der Cyclooxygenase und verhindern somit die Prostaglandinsynthese. Sie inaktivieren das Enzym irreversibel.

Prostaglandine sind in ihrer Wirkung sehr vielfältig. Sie kontrollieren die Kontraktion glatter Muskulatur, greifen in die Ausschüttung von Zellprodukten ein, beeinflussen die Zellwanderung und -aggregation und steigern die Schmerzempfindlichkeit. Zudem sind sie neben Histamin und Bradykinin Mediatoren von Entzündungsreaktionen und führen bei einer pyrogeninduzierten Produktion zu Temperaturanstieg.

NSAIDs besitzen drei Wirkqualitäten unterschiedlicher Ausprägung:

1. analgetisch
2. antipyretisch
3. antiphlogistisch

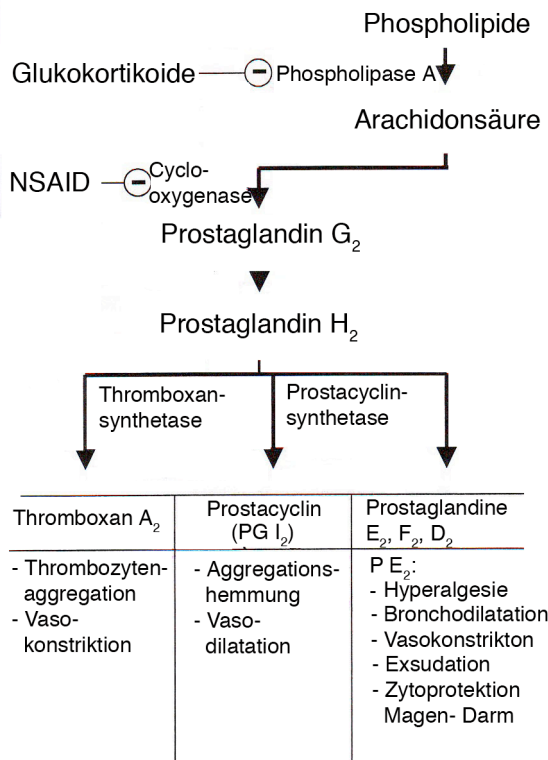
Sie entfalten ihre Wirkung teilweise über einen Eingriff in das ubiquitäre Prostaglandinsystem, teilweise über verschiedene und noch unvollständig erforschte zelluläre und molekulare Mechanismen der peripheren und zentralen Antinozizeption.

Prostaglandine gehören zu der Gruppe der Eicosanoide, die eine große Gruppe von Mediatoren darstellen. Sie werden aus der inaktiven Vorstufe, der Arachidonsäure, einer mehrfach gesättigten Fettsäure, gebildet.

Arachidonsäure ist Bestandteil der Phospholipide der Zellmembran und wird von dort, nach Zellstimulation, durch die Phospholipase A2 freigesetzt. In einer Zweischnitt-Reaktion und unter Sauerstoffverbrauch, wird Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase (COX) in Prostaglandin H₂ und weiter zu Prostaglandinen verarbeitet.

Abbildung 25

Synthese und Aufgaben der Prostaglandine.

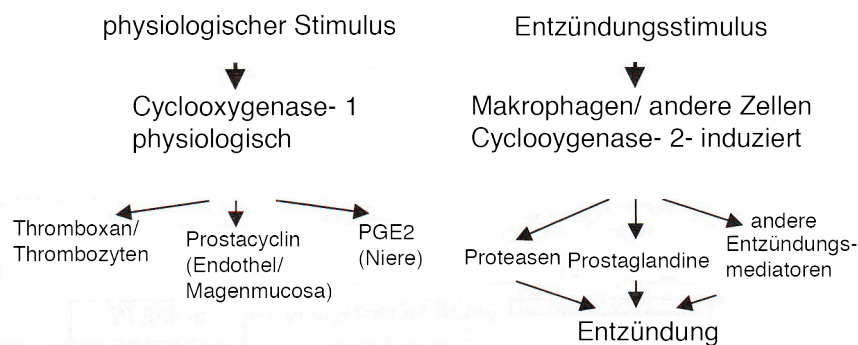


Heute sind zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase bekannt:

1. COX- 1 erfüllt physiologische Funktionen im gesunden Gewebe, wie die Synthese von Thromboxan, Prostacyclin und PG E₂.
2. COX- 2 wird durch Entzündungsstimuli aktiviert und setzt Prostaglandine und andere Entzündungsmediatoren frei.

Abbildung 26

Cyclooxygenase 1 und 2.



Hierdurch entstand die vereinfachende Hypothese, dass der therapeutische Effekt durch Hemmung der COX- 2 und die Nebenwirkungen durch die Hemmung der COX-1 entsteht [69].

Zu den COX- abhängigen- Wirkungen bzw. Nebenwirkungen gehören gastrointestinale, renale und respiratorische Beschwerden sowie die Thrombozytenaggregationshemmung, die Wehenhemmung und ZNS- Beschwerden [69].

Einige COX- unabhängige Wirkungsmechanismen von NSAIDs wurden bereits beobachtet. Diese Mechanismen umfassen zum Beispiel die Abkoppelung der oxidativen Phosphorylisation [68], die Hemmung der Funktion Neutrophiler [1, 24] sowie einen antagonistischen Effekt auf G- Proteine [2, 5].

Der Einsatzbereich von NSAIDs umfasst Schmerzen, Fieber, akute und chronische Entzündungen, z.B. rheumatische Erkrankungen und Gicht.

Aspirin[®] wird, wegen seiner Präferenz für COX- 1, außerdem zur Thrombozytenaggregationshemmung zur Prävention kardialer und cerebraler Ischämien [44, 45] eingesetzt.

Weiterhin erwiesen sich NSAIDs als effektiv in der Behandlung und Prävention einer Reihe von nicht- entzündlichen Erkrankungen, sowie gastrointestinaler, insbesondere kolorektaler Tumoren [18, 37, 48, 103, 106, 126].

Zudem gibt es epidemiologische Hinweise, die eine vorteilhafte Rolle von NSAIDs beim Risiko der Alzheimerschen Erkrankung stützen [12, 16, 64, 79, 104, 126, 128].

In beiden Fällen wird als Mechanismus die COX- Hemmung diskutiert, letztlich sind die Wirkmechanismen aber noch nicht gänzlich geklärt.

Nur einige der erwünschten und unerwünschten pharmakologischen Effekte lassen sich durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese erklären. In den letzten Jahren kam die Diskussion auf, dass dieser Hemmung alleine nicht alle Effekte zugeschrieben werden können.

So zeigen bestimmte Prostaglandine selbst bei Arthritis im Tiermodell antiinflammatorische Wirkung [131], und manche NSAIDs versagten als COX- Inhibitoren [14]. Es müssen demnach alternative Wirkmechanismen neben der COX- Wirkung vorhanden sein.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass klinisch relevante Dosen von Acetylsalicylsäure [22, 42] und Diclofenac die LPA- Signalkaskade, einen G- Protein- gekoppelten Übertragungsweg, hemmen. Die Inhibition ist dosisabhängig und reversibel.

4.1.2 Lysophosphatidsäure

Lysophosphatidsäure (LPA) ist ein normaler Bestandteil aller Zellen und eine Zwischenstufe der Lipidsynthese. Weiterhin agiert es als interzelluläres Signalmolekül [93, 98]. Im Serum findet sich LPA an Albumin in Konzentrationen von 2- 20µM [34, 92].

LPA aktiviert verschiedene Subtypen von Rezeptoren, die an unterschiedliche heterotrimerische G- Proteine gekoppelt sind. Dies ruft eine Reihe von biologischen und pathophysiologischen Antworten in verschiedenartigen Zellen hervor [93, 97].

Lysophosphatidsäure ist eine in ihrer Wirkung gut untersuchte Substanz.

Zu den ersten festgestellten Effekten gehörte die Induktion der Plättchenaggregation [75] sowie die Kontraktion glatter Muskulatur [121] sowie einige weitere Effekte im Rahmen der Wundheilung und Geweberegeneration.

Im letzten Jahrzehnt wurde eine breite Menge an Wirkungen von LPA dokumentiert. Diese beinhalten auch die Induktion der Mitogenese, die Neuritenretraktion und die Chemotaxis.

Die Zellmigration spielt aber nicht nur bei physiologischen Prozessen wie Entzündungen und Wundheilung, sondern auch bei pathologischen Prozessen wie Tumorwachstum und die Steigerung der Tumorzellinvasivität [93] eine Rolle.

Erhöhte Plasmalevel von LPA wurden bei Patientinnen mit Ovarialtumoren gefunden. Daraus entstand die Vermutung, LPA könnte ein Tumormarker im Frühstadium des Ovarialkrebs sein [35], außerdem spielt LPA eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und dem Wachstum des Ovarialkrebs [81].

Weiterhin ist LPA ein wichtiger und potenter Stimulus für die Progression des Kolonkarzinoms [107].

Zudem wurde gezeigt, dass LPA eine Rolle bei der Pathogenese von Atherosklerose und der thrombotischen Komplikationen spielt. LPA akkumuliert sich in den atherosklerotischen Plaques und agiert dort als Plättchen- aktivierendes Lipid [110].

Insgesamt zeigen NSAIDs gegenteilige Effekte zu den oben erwähnten LPA- Effekten.

Die Wirkung von NSAIDs auf Entzündungen und Koagulation wurde bereits intensiv studiert und dokumentiert.

Nun wurde ein präventiver Effekt von NSAIDs auf die Entwicklung von gastrointestinalen [48], ovarialen [27, 116] und anderen Tumoren [52] gezeigt.

Ob dieser Nebeneffekt der NSAIDs neben der Hemmung der Cyclooxygenase und damit der Prostaglandinsynthese auch einer Störung in der normalen G- Protein-Funktion in der LPA- Signalübertragungskaskade zu geschrieben werden kann, ist rein hypothetisch und bleibt zu zeigen. Nichtsdestotrotz, diese Analogien, zusammen mit der physiologischen Ausbildung des LPA- Rezeptors auf *Xenopus laevis*- Oozyten [40, 47], machten den LPA-Rezeptor attraktiv, um die Hypothese der Wechselwirkungen zwischen NSAIDs und G- Proteinen näher zu betrachten.

4.1.3 Die G- Protein- Kaskade

Neben LPA gibt es viele Moleküle, die ihr Signal durch G- Proteine übertragen. 80 % aller bekannten Rezeptoren sind G- Protein gekoppelt [13].

Prostaglandine (PGE_2) zum Beispiel, wichtig bei der Erzeugung von Fieber, Entzündung und mechanischer Hyperalgesie, leitet Signale durch ein Gq- Protein. Da NSAID nun außer der Cyclooxygenase auch das G- Protein selbst hemmen, könnte dies bedeuten, dass neben der Reduktion der Prostaglandin- Produktion (COX- abhängig) selbst, auch die normalen biologischen Effekte der Prostaglandine durch NSAIDs gestört werden.

Ein weiterer interessanter G- Protein gekoppelter Rezeptor ist der Cholecystinin (CCK)- B-/Gastrin- Rezeptor. Durch Versuche mit Knock- Out- Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieser GPCR notwendig ist für das physiologische Wachstum bestimmter gastrischer Mucosazellen in vivo [96]. Wechselwirkungen mit dem G- Protein in der Signalkaskade des Rezeptors können eine Atrophie der Mucosa herbeiführen und damit unerwünschte Wirkungen der NSAIDs erklären.

Wechselwirkungen mit dem normalen Signalweg des pro- aggregatorisch und vasokonstriktorisch wirkenden Agens Thromboxan (TXA_2), ebenfalls Gq- gekoppelt,

könnten eine zusätzliche Erklärung für die vorteilhafte Rolle der Acetylsalicylsäure in der Prävention und Therapie von thromboembolischen und ischämischen Prozessen sein.

Obwohl hypothetisch, könnten Wechselwirkungen mit den G- Proteinen, wie in dieser Arbeit dargetellt, einige vorteilhafte und auch unerwünschte Effekte der NSAIDs erklären.

Die G- Protein- Kaskade lässt sich in unserem Modell gut manipulieren. Hierzu wurden bereits in anderen Studien verwendete Substanzen in die Zellen injiziert um die Kaskade an dem gewünschten Ort in Gang zu setzen: IP_3 setzt Ca^{2+} direkt über Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum frei [85, 115]. Geneticin, G418, aktiviert direkt die Phospholipase C [95]. AlF_4^- und $GTP\gamma S$ wirken direkt am G- Protein. Ersteres bildet mit dem GDP einen GTP- unabhängigen Komplex [10, 43, 109] und letzteres agiert als nicht hydrolysierbares Analogon von GTP und aktiviert das G- Protein somit irreversibel [115].

4.1.4 Die Oozyten des *Xenopus laevis*

Um die Pharmakologie G- Protein gekoppelter Rezeptoren zu studieren, wurden die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches verwendet.

Über die Verwendung des *Xenopus laevis* in der Medizin und die Vorteile seiner Oozyten bei elektrophysiologischen Untersuchungen wurde bereits in früheren Abschnitten gesprochen. Zusammengefasst weisen sie eine gut zu handhabende Größe auf, sind widerstandsfähig, sind in ausreichend großen Mengen und gleichbleibender Qualität zu gewinnen, mittels Mikroelektroden können Ladungsverschiebungen beobachtet werden und es kann Material in die Zelle injiziert werden ohne diese in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. Zudem besitzen die Oozyten nur wenige zelleigene Kanäle [111] und LPA- Rezeptoren [15, 78]. Hierdurch ist die Untersuchung eines bestimmten Rezeptors möglich.

Probleme/ Grenzen bei der Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen

Menschliche Zellen stehen in einem Stoffwechselsystem mit einer Temperatur von etwa 37,4°C, mit geringen Schwankungen. Temperaturen unter 32°C gelten als letal, Stoffwechsel und elektrophysiologische Übertragungen geraten aus dem Gleichgewicht. Die Messungen an den Oozyten finden bei Raumtemperatur von 25°C statt. Eine Anhebung der Temperatur in unserem Modell wäre nicht sinnvoll, da der Rezeptor nur unter natürlichen Bedingungen arbeitet. Die Membranintegrität wäre gefährdet. Fraglich ist nun, ob die Temperaturdifferenz eine wesentliche Rolle für die hier dargestellten Ergebnisse spielt. Bekannterweise liefert das Oozyten- Modell im Gegensatz zu anderen Modellen, trotz der Temperaturdifferenz, zuverlässige Ergebnisse für G- Protein-gekoppelte Rezeptoren [59]. Nachgewiesene Einflüsse der Temperatur beziehen lediglich sich auf die Aktivierung des Rezeptor nach Stimulation, auf die Latenzzeit [90, 91], die einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Ladungsverschiebung hat.

Die Sequenzen der LPA-Rezeptoren weisen zwischen den einzelnen Säugetierspezies eine große Übereinstimmung auf, beispielsweise für Maus und Mensch teilweise 90% bzw 97% (lpA2-3 bzw. lpA1). Die Homologie der *Xenopus laevis*- Rezeptoren im Vergleich zu den humanen ist jedoch gleich viel niedriger. Dies liegt vielleicht auch an den unterschiedlichen natürlichen Bedingungen unter denen der Rezeptor funktionieren muss (Temperaturdifferenz, s.o.).

Die grundsätzliche Signaltransduktion ist wiederum ähnlich und die G- Protein-Rezeptor vermittelte Calciumfreisetzung findet sich auch bei den humanen LPA-Rezeptoren [6].

4.1.5 Das Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Modell

Mit der Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Methode [19, 84] wurde ein System gefunden, welches es ermöglicht, die Pharmakologie des Rezeptors an funktionsfähigen Zellen zu untersuchen. Das Modell ist ein sensibles und etabliertes System zur Darstellung von Membranpotentialen in großen Zellen, wie den Oozyten des *Xenopus laevis*, über einen ausreichend langen Zeitraum. Es besteht zudem die Möglichkeit, die

dem zu untersuchenden Rezeptor nachgeschaltete Signalübertragungskaskade durch intrazelluläre Injektion bewährter Substanzen zu manipulieren [54, 76, 101].

Artefakten durch Wechselströme werden durch einen zwischengeschalteten Filter unterdrückt. Störströme werden durch einen Faraday'schen Käfig, der Setup umgibt verringert.

Die Auswertsoftware wurde zur schnellen Analyse der Daten, einer lückenlosen Selbstdokumentation und einer kompakten Speicherung der Daten designed [29].

4.2 Ergebnisse

4.2.1 NSAIDs beeinflussen die LPA- Funktion

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass Acetylsalicylsäure und Diclofenac die G- Protein- Signalkaskade am G- Protein in klinisch relevanten Dosen hemmen.

Beide getesteten NSAIDs inhibieren das LPA- Signal signifikant mit einem halbmaximalen Effekt bei $3,75 \pm 1,32 \times 10^{-6}$ M bzw. $1,90 \pm 0,67 \times 10^{-6}$ M jeweils für ASS und Diclofenac. Plasmalevel von etwa 10^{-5} bis 3×10^{-3} M für ASS sind bekannt [22, 42]. Spitzenkonzentrationen von ASS werden 30 Minuten nach Einnahme von niedrigdosiertem Aspirin (80 mg) erreicht und liegen bei etwa $3,3 \times 10^{-6}$ M (1 µg/ mL). Für Diclofenac sind Spitzenlevel im Plasma, bei einer Einzeldosis von 50 mg, zwischen $3,3 \cdot 10^{-6}$ M bekannt [108].

Diese klinisch beobachteten Plasmakonzentrationen beider NSAIDs haben die Funktion des LPA in dem in- vitro- Modell signifikant beeinflusst.

4.2.2 Die Stoffwechselkaskade

Wie bereits beschrieben ist der LPA- Rezeptor ein G- Protein- gekoppelter Rezeptor. Durch Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Konformationsänderung und ein G- Protein wird gebunden und aktiviert. Es zerfällt in eine α - Einheit und eine $\beta\gamma$ - Einheit. Die α - Einheit, gebunden an GTP, bindet an ein Effektorprotein und ändert dessen Aktivität.

Das Effektorprotein, hier die Phospholipase C, setzt aus dem Membranlipid, Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) die Second- Messenger Inositol-1, 4, 5- trisphosphat und Diacylglycerol frei.

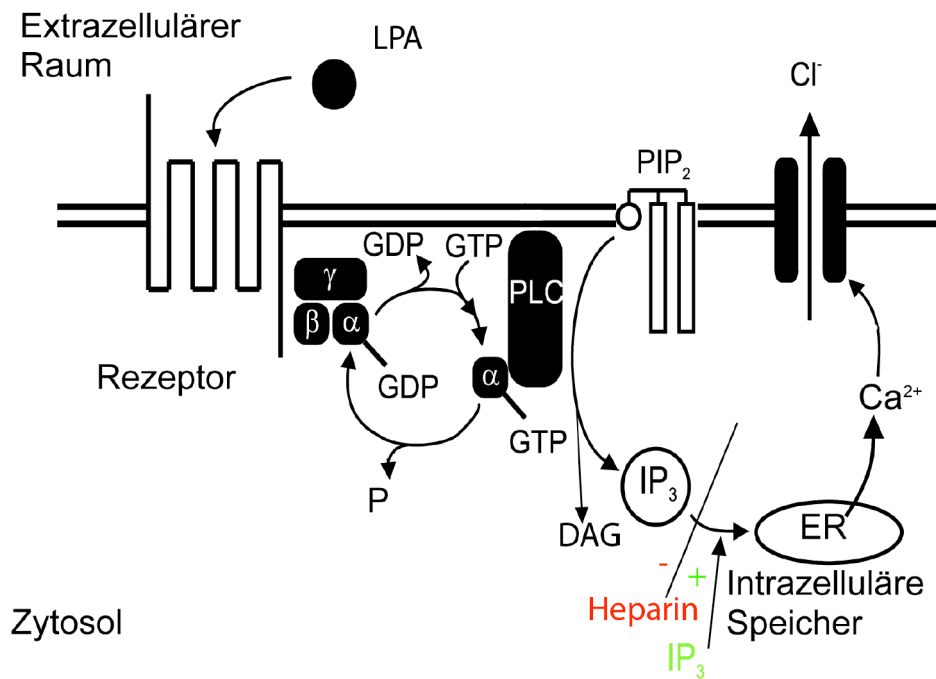
Das lipophile DAG verbleibt in der Membran. Das hydrophile IP₃ bewirkt am endoplasmatischen Retikulum die Ausschüttung von Ca²⁺ aus seinem Speicher. In den Xenopus laevis- Oozyten wird über einen calciumabhängigen Chloridkanal nun ein vorübergehender Chlorideinstrom hervorgerufen [32, 39, 40].

In dieser Untersuchung war es möglich durch IP₃- Injektion Ca²⁺ freizusetzen und einen vorübergehenden Chlorideinstrom hervorzurufen.

Durch Blockierung des IP_3 mittels Heparin konnten wir zeigen, dass die Injektion von IP_3 tatsächlich über IP_3 - Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} freisetzt und somit Teil der Signalkaskade ist. Durch die Blockade des IP_3 - Rezeptors mit Hilfe von niedermolekularem Heparin wurden die Chloridströme $I_{Cl(Ca)}$ um 87 % supprimiert.

Abbildung 27

Schemazeichnung der G- Protein- Kaskade mit den Angriffspunkten von IP_3 und Heparin.



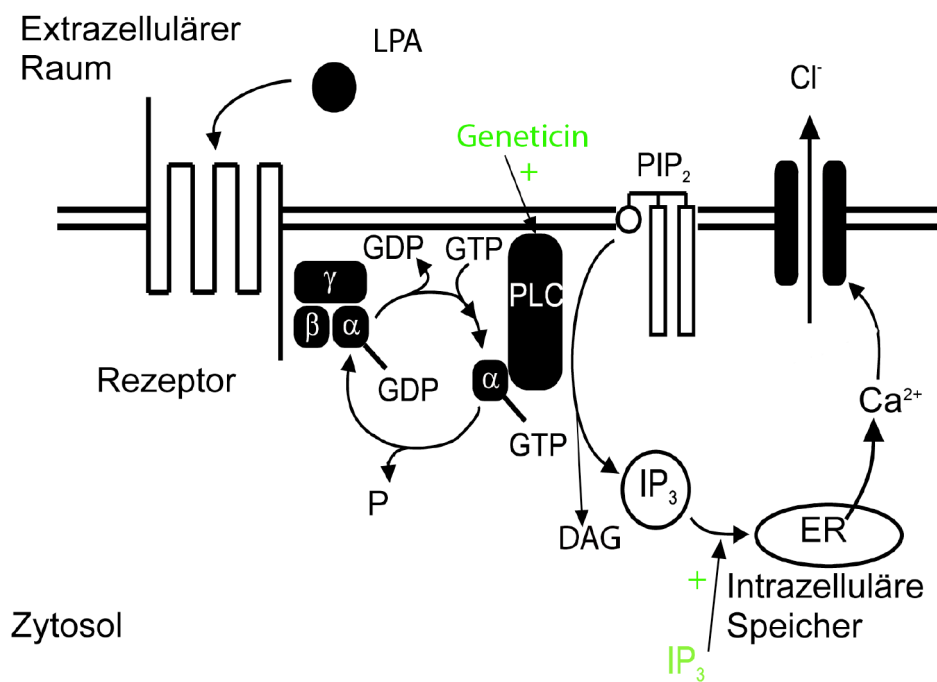
Zwischen Phospholipase C und Endoplasmatischem Retikulum

Um den exakten Angriffspunkt in der LPA- Signalkaskade herauszufinden, wird jedes einzelne Segment des Signalweges durch direkte intrazelluläre Injektion des jeweiligen Stimulus (IP_3 , G418, $\text{GTP}\gamma\text{S}$ und AlF_4^-) stimuliert.

Weder durch IP_3 noch durch G418 (Geneticin) hervorgerufene Ströme werden signifikant durch die IC_{50} Konzentrationen von ASS (101,79%, bzw. 90,17%) oder Diclofenac (78,22%, bzw. 70,31%) beeinflusst.

Abbildung 28

Schemazeichnung der Signalkaskade und ihrer Manipulation. Angriffsorte von IP_3 und G418 (Geneticin).



Die Rolle des G-Proteins

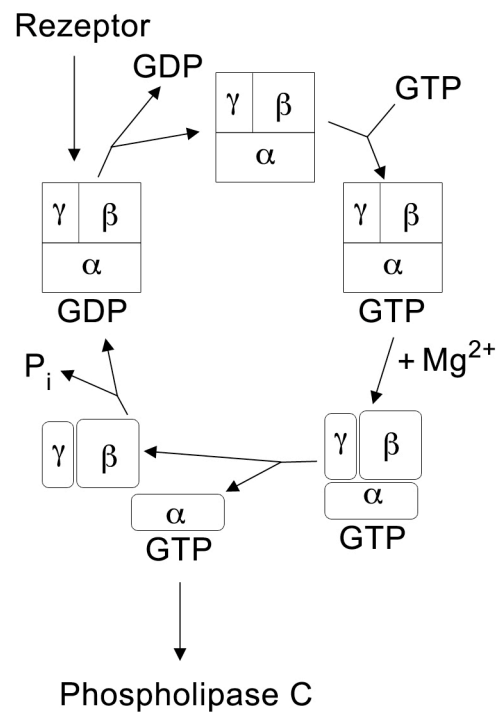
Das G-Protein besteht aus 3 Untereinheiten: α , β und γ . Die letzteren bilden ein festes Dimer, welches nur durch Denaturierung aufgespalten werden kann. Die α - Untereinheit ist fest an GDP gebunden welches durch GTP ausgetauscht werden kann. Binden Agonisten an den Rezeptor entsteht kurzzeitig ein Komplex aus Agonist, Rezeptor und G-Protein. Dieser führt zu einem beschleunigtem Austausch von GDP und GTP und somit einer Aktivierung des G-Proteins. Es dissoziiert in das β - γ - Dimer und einen Komplex aus der α - Unterheit, GTP und Magnesium. Die α - Unterheit hat eine intrinsische GTPase-Aktivität, die zu einer Abspaltung einer Phosphatgruppe von GTP führt und damit den Komplex inaktiviert.

Abbildung 29

Das G-Protein und sein Zyklus nach Aktivierung des Rezeptors.

Durch Konformationsänderung des Rezeptors nach Aktivierung durch einen Agonisten, bindet das G-Protein an den Rezeptor. Es kommt zum Austausch von GDP gegen GTP.

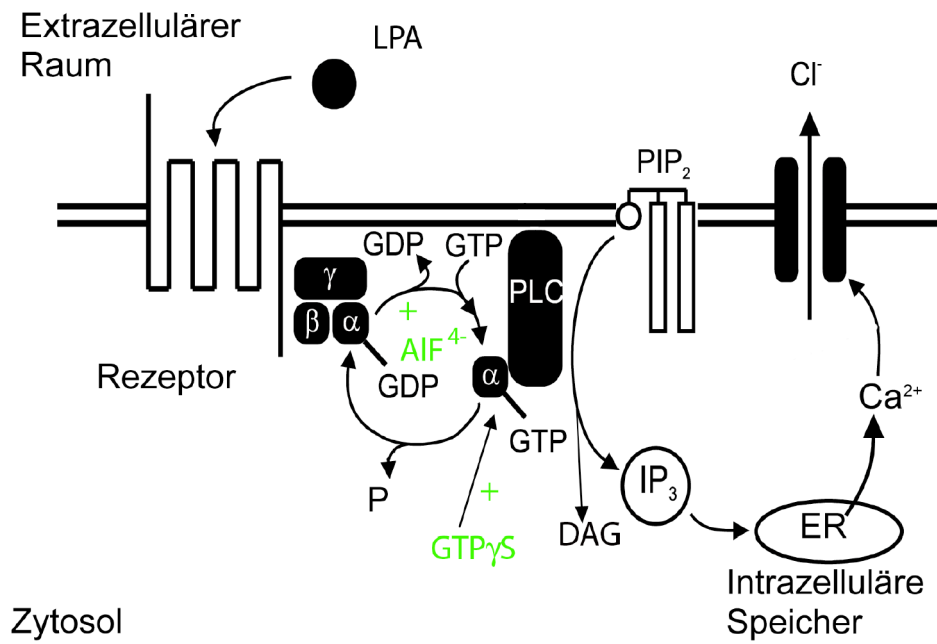
Das G-Protein spaltet sich in seine α - und β - γ - Untereinheiten. Die α - Untereinheit bildet mit GTP und Mg^{2+} einen Komplex, der wie auch das β - γ -Dimer einen Effektor, im ersten Fall die Phospholipase C, aktivieren kann. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α - Untereinheit wird eine Phosphatgruppe abgespalten und das G-Protein wird zurück in den inaktiven Komplex überführt.



Um das G- Protein selbst genauer zu untersuchen wurden GTP γ S und AlF₄⁻ intrazellulär injiziert.

Abbildung 30

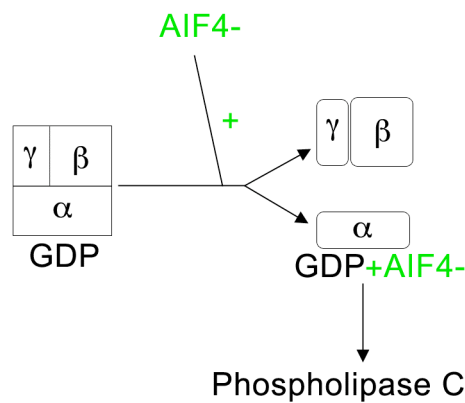
Schemazeichnung der Signalkaskade und ihrer Manipulation. Angriffsorte von $GTP\gamma S$ und AlF_4^- .



Aluminiumfluorid ist ein GTP- Bindungsstellen unabhängiger G- Protein-Aktivator, welcher ein GDP- AlF_4^- - Komplex bildet und so eine G- Protein- Aktivierung auslöst indem es gebundenes GTP nachahmt [10, 109] und so die Phospholipase C in Gang setzt. Bei AlF_4^- - Injektion zeigten die Einwärtsströme keine signifikanten Änderungen nach Inkubation in den NSAID- Lösungen (ASS 182,26% bzw. Diclofenac 93,55%).

Abbildung 31

Aluminiumfluorid bindet nach Injektion an das G- Protein- Zyklus und bildet mit GDP einen Komplex, der die Phospholipase C unabhängig von GTP aktiviert.

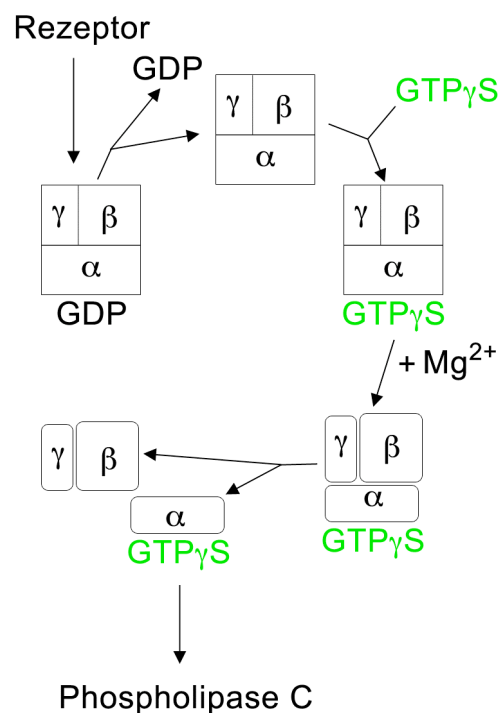


GTP γ S hingegen ist ein nicht- hydrolysierbares Analogon von GTP. Es macht das aktivierte G- Protein resistent gegen die GTPase und aktiviert es somit permanent.

Die Chloridströme $I_{Cl(Ca)}$, die durch Injektion von GTP γ S ausgelöst wurden, wurden unter ASS- und Diclofenac- Vorbehandlung hingegen signifikant (41% bzw. 46%; $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) gesenkt.

Abbildung 32

GTP γ S bindet an Stelle von GTP an das G- Protein und aktiviert dieses permanent, da es nicht hydrolysierbar ist.



Nun kann der Effekt der NSAIDs in der LPA- Signalkaskade auf das G- Protein eingeschränkt werden, genauer: auf die GTP- bindende Seite des G- Proteins.

Zusammengefasst konnten wir die in der Einleitung gesetzten Ziele wie folgt beantworten: Die Daten zeigen eindeutig eine signifikante Inhibition der LPA-

Rezeptor- Funktion durch beide untersuchten NSAIDs, Acetylsalicylsäure und Diclofenac. Beide Medikamente wirkten im klinisch relevanten Bereich hemmend auf die Rezeptoren funktionsfähiger Zellen. Der Mechanismus ist reversibel und kann auf das G- Protein eingegrenzt werden.

5. Zusammenfassung

Diese Studie zeigte erstmals an funktionsfähigen Zellen, dass und durch welche Mechanismen Aspirin und Diclofenac auf die G- Protein- Kaskade wirken.

Als Rezeptor wurde der G- Protein gekoppelte LPA- Rezeptor gewählt.

Lysophosphatidsäure ist eine in ihrer Wirkung gut untersuchte Substanz. Das aus den Blutplättchen stammende LPA hat alle wichtigen Merkmale eines Mediators der Wundheilung und Geweberegeneration. LPA ist ein Produkt des Blutkoagulationprozesses und befindet es sich natürlicherweise im Serum. Den NSAIDs wird eine Wirkung zugeschrieben, die den Effekten von LPA entgegengesetzt ist.

80% aller bekannten Membran- Rezeptoren sind G- Protein- gekoppelte Rezeptoren, GPCR, weshalb Wechselwirkungen mit dem kleinen Molekül bereits große Auswirkungen haben können.

Am Zwei- Elektroden- Voltage- Clamp- Modell konnte die Pharmakologie des Rezeptors an funktionsfähigen Zellen untersucht werden. Das Modell ist ein sensibles und etabliertes System zur Darstellung von Membranpotentialen in großen Zellen, wie den Oozyten des *Xenopus laevis* Krallenfrosches.

Bisher wurde lediglich in In-vitro-Studien mit [³⁵S]GTP γ S (Guadenosintriphosphat) auf Membranen gereinigter Neutrophiler, nicht an funktionsfähigen Zellen, gezeigt [1-4], dass NSAIDs mit dem G- Protein wechselwirken.

Nach dieser Studie können die eingangs gestellten Fragen beantwortet werden: Aspirin und Diclofenac hemmen in klinisch relevanten Konzentrationen, reversibel die G- Protein- gekoppelte Rezeptoren. Der Wirkungsort liegt in der G- Protein- Kaskade und kann auf zwei Lokalisationen eingegrenzt werden: Beide NSAIDs beeinflussen entweder das G- Protein auf der Seite des GTP- GDP- Austausches oder den Rezeptor selbst, z.B. auf der intrazellulären Seite.

Folgende Möglichkeiten bleiben offen:

1. Die NSAIDs könnten die α - Untereinheiten, die unwiederbringlich durch GTP γ S aktiviert wurden, am Andocken an das Effektorprotein, die PLC, hindern und somit deren Aktivierung stören.

2. Die Analgetika könnten das G- Protein selbst angreifen, und somit den Austausch des GDP gegen GTP verhindern, wodurch das G- Protein nicht aufspaltbar und damit inaktiv wäre.

3. NSAIDs könnten den Rezetor selbst beeinflussen, z.B an seinen intrazellulären Schleifen oder an dem C-terminalen Ende und die Bindung des G-Proteins und den Austausch von GDP zu GTP verhindern. Dies könnte einen Teil der nicht geklärten, COX- unabhängigen pharmakologischen Effekte der NSAIDs erklären und neue therapeutische Möglichkeiten aufzeigen.

Die Bandbreite der pharmakologischen Wirkungen von nichtsteroidalen Antiphlogistika (nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs) kann nicht mehr allein auf die seit langem bekannte Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase (COX) [69, 125] zurückgeführt werden. Die Hemmung der Prostaglandinsynthese [125] ist zwar der Haupteffekt, aber nicht der einzige Effekt der NSAID- Wirkung.

Neben LPA wirken viele andere Enzyme durch GPCR.

Zum Beispiel PGE₂, wichtig für die Fieberentstehung, Entzündung und mechanische Hyperalgesie, wirkt ebenfalls über GPCRs. Es könnte bedeuten, dass neben einer COX-vermittelten Minderproduktion von PGE₂ auch die normalen biologischen Effekte am G-Protein gestört werden.

Ein weiterer GPCR ist der Cholecystokinin (CCK)- B/Gastrin- Rezeptor. Nagata et al. zeigten an Knock-out Mäusen, dass dieser GPCR essentiell für das physiologische Wachstum bestimmter Mucosazellen ist [96]. Störungen der G-Protein-Kaskade könnten eine Atrophie der Mucosa bewirken, wie es bei den Knock- out- Mäusen der Fall war.

Störungen des normalen Signalweges des proaggregatorischen und vasokonstriktorischen Agonisten Thromboxan (TXA₂), ebenfalls über einen GPCR wirkend, kann eine zusätzliche Erklärung der vorteilhaften Rolle von ASS in der Prävention und Therapie thrombembolischer und ischämischer Prozesse sein.

Wenn auch hypothetisch, Wechselwirkungen mit dem G-Protein dieser verschiedenen GPCRs können eine zusätzliche Erklärung für die vorteilhaften und auch unerwünschten Effekte der NSAIDs sein.

6. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

AlCl ₃	Aluminiumchlorid
AlF ₄	Aluminiumfluorid
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Rinderalbumin (engl.: bovine serum albumin)
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	Cyclisches Adenosin- Monophosphat
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
Cl ⁻	Chloridion
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxy-Nuklein-Säure (-Acid)
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration eines Stoffes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (-acid)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G418	Geneticin
GDP	Guanin- di- phosphat
GPCR	G- protein- coupled- receptor
GTP	Guadenosintrisphosphat
GTP _γ S	synthetisch hergestellte stabile Untereinheit des Guadenosintrisphosphat
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz (physikalische Einheit: [1/ s])
I _{Cl(Ca)}	Stromstärke (I), die den Lipidbilayer passiert durch den kalziumabhängigen (Ca ²⁺) Chloridkanal (Cl ⁻)
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration des Wirkstoffs
IP ₃	Inositoltrisphosphat
KCl	Kaliumchlorid
LPA	Lysophosphatsäure (engl.: lysophosphatidic acid)
HWZ	Halbwertzeit
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure (-acid)
MW	Molekulargewicht
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid- Kochsalz
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid- Natronlauge
NSAID	Nichtsteroidales antiinflammatorisches Medikament (engl.: non-steroidale antiinflammatory drug)

OP	Operation
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCL	Phospholipase C
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration (potentia Hydrogenii) $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
pK_a	Negativer dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante einer Säure
PLA2	Phospholipase A2
R	Widerstand (engl.: resistance)
RNA	Ribonucleinsäure (-acid)
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
TGF	Tumor- Growth- Factor
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** *Xenopus laevis*- Weibchen.
- Abbildung 2** *Operation eines Frosches.*
- Abbildung 3** *Schemazeichnung Oozytenaufbau.*
- Abbildung 4** *Defollikulierte Zellen.*
- Abbildung 5** *Schemazeichnung des Setups.*
- Abbildung 6** *Transmembranöser LPA- Rezeptor.*
- Abbildung 7** *Übertragungskaskade vom Andocken des Agonisten an den LPA- Rezeptor bis zum Öffnen des Chloridkanals.*
- Abbildung 8** *Manipulation der durch LPA in Gang gebrachten Signalkaskade.*
- Abbildung 9** *LPA- Herstellung aus neu gebildeter Phosphatidsäure in aktivierten Zellen durch Deacylierung durch PLA2.*
- Abbildung 10** *Strukturformel der Acetylsalicylsäure.*
- Abbildung 11** *Strukturformel des Diclofenac.*
- Abbildung 12** *Lysophosphatsäure (LPA)- Signal in Xenopus laevis Oozyten nach Applikation von LPA (A) und nach Applikation der Trägerlösung (B).*
- Abbildung 13** *LPA aktiviert den LPA- Rezeptor in Xenopus laevis Oozyten konzentrationsabhängig.*
- Abbildung 14** *Lysophosphatsäure -Signal induziert durch 1µM LPA in Kontrollzellen und in Oozyten, die zehn Minuten in Acetylsalicylsäure inkubiert waren.*
- Abbildung 15** *ASS inhibiert das LPA- Rezeptor- Signal in einer konzentrationsabhängigen Weise.*
- Abbildung 16** *Dosis- Inhibitionskurve von ASS auf LPA 10⁻⁶M.*
- Abbildung 17** *Lysophosphatsäure- Signal induziert durch 1µM LPA in Kontrollzellen und in Oozyten, die zehn Minuten in Diclofenac inkubiert waren.*
- Abbildung 18** *Diclofenac inhibiert das LPA- Rezeptor- Signal in einer konzentrationsabhängigen Weise.*
- Abbildung 19** *Dosis- Inhibitionskurve von Diclofenac auf LPA 10⁻⁶M.*

- Abbildung 20** zeigt die Reversibilität der Inhibition von ASS und Diclofenac auf die LPA- Antwort.
- Abbildung 21** Balkendiagramm zur Inhibition von IP_3 - induzierten $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.
- Abbildung 22** Balkendiagramm zur Inhibition Geneticin(G418)- induzierter $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.
- Abbildung 23** Balkendiagramm zur Inhibition $GTP\gamma S$ - induzierter $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.
- Abbildung 24** Balkendiagramm zur Inhibition AlF_4^- -induzierter $I_{Cl(Ca)}$ durch NSAIDs in Prozent.
- Abbildung 25** Synthese und Aufgaben der Prostaglandine.
- Abbildung 26** Cyclooxygenase 1 und 2.
- Abbildung 27** Schemazeichnung der G- Protein- Kaskade und seiner Manipulation mit den Angriffspunkten von IP_3 und Heparin.
- Abbildung 28** Schemazeichnung der G- Protein- Kaskade und seiner Manipulation mit den Angriffspunkten von IP_3 und Geneticin (G418)
- Abbildung 29** Das G- Protein und sein Zyklus nach Aktivierung des Rezeptors.
- Abbildung 30** Schemazeichnung der G- Protein- Kaskade und seiner Manipulation mit den Angriffspunkten von $GTP\gamma S$ und AlF_4^-
- Abbildung 31** Der Einfluss von AlF_4^- auf das G- Protein nach Injektion.
- Abbildung 32** Der Einfluss von $GTP\gamma S$ auf das G- Protein nach Injektion.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1** Standardlösungen
- Tabelle 2** ASS und Diclofenac, IC_{50} – Werte

Literaturverzeichnis

1. Abramson, S.B., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. Studies in human neutrophils and liposomes.* Inflammation, 1990. **14**(1): p. 11-30.
2. Abramson, S.B., et al., *Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDs): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid.* Biochem Pharmacol, 1994. **47**(3): p. 563-72.
3. Abramson, S.B., J. Leszczynska-Piziak, and G. Weissmann, *Arachidonic acid as a second messenger. Interactions with a GTP-binding protein of human neutrophils.* J Immunol, 1991. **147**(1): p. 231-6.
4. Abramson, S.B. and G. Weissmann, *The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs.* Arthritis Rheum, 1989. **32**(1): p. 1-9.
5. Amin, A.R., et al., *The pleiotropic functions of aspirin: mechanisms of action.* Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(3-4): p. 305-12.
6. An, S., et al., *Identification of cDNAs encoding two G protein-coupled receptors for lysophospholipids.* FEBS Lett, 1997. **417**(3): p. 279-82.
7. An, S., et al., *Recombinant human G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors mediate intracellular calcium mobilization.* Mol Pharmacol, 1998. **54**(5): p. 881-8.
8. An, S., et al., *Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(3): p. 619-22.
9. Bandoh, K., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid.* J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27776-85.
10. Bigay, J., et al., *Fluoride complexes of aluminium or beryllium act on G-proteins as reversibly bound analogues of the gamma phosphate of GTP.* Embo J, 1987. **6**(10): p. 2907-13.
11. Birnbaumer, L., *G proteins in signal transduction.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990. **30**: p. 675-705.
12. Blasko, I. and B. Grubeck-Loebenstien, *Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease.* Drugs Aging, 2003. **20**(2): p. 101-13.
13. Bockaert, J., *Coupling of receptors to G proteins, pharmacological implications.* Therapie, 1991. **46**(6): p. 413-20.
14. Bombardier, C., P.M. Peloso, and C.H. Goldsmith, *Salsalate, a nonacetylated salicylate, is as efficacious as diclofenac in patients with rheumatoid arthritis. Salsalate-Diclofenac Study Group.* J Rheumatol, 1995. **22**(4): p. 617-24.
15. Boton, R., et al., *Two calcium-activated chloride conductances in Xenopus laevis oocytes permeabilized with the ionophore A23187.* J Physiol, 1989. **408**: p. 511-34.
16. Breitner, J.C. and P.P. Zandi, *Do nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce the risk of Alzheimer's disease?* N Engl J Med, 2001. **345**(21): p. 1567-8.
17. Browne, C.L. and W. Werner, *Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of Xenopus laevis.* J Exp Zool, 1984. **230**(1): p. 105-13.

18. Chan, T.A., *Cyclooxygenase inhibition and mechanisms of colorectal cancer prevention*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003. **3**(6): p. 455-63.
19. Charbonneau, M. and N. Grandin, *The egg of Xenopus laevis: a model system for studying cell activation*. *Cell Differ Dev*, 1989. **28**(2): p. 71-93.
20. Chun, J., *Lysophospholipid receptors: implications for neural signaling*. *Crit Rev Neurobiol*, 1999. **13**(2): p. 151-68.
21. Chun, J., J.J. Contos, and D. Munroe, *A growing family of receptor genes for lysophosphatidic acid (LPA) and other lysophospholipids (LPs)*. *Cell Biochem Biophys*, 1999. **30**(2): p. 213-42.
22. Cianferoni, A., et al., *Selective inhibition of interleukin-4 gene expression in human T cells by aspirin*. *Blood*, 2001. **97**(6): p. 1742-9.
23. Contos, J.J., I. Ishii, and J. Chun, *Lysophosphatidic acid receptors*. *Mol Pharmacol*, 2000. **58**(6): p. 1188-96.
24. Cronstein, B.N., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit stimulated neutrophil adhesion to endothelium: adenosine dependent and independent mechanisms*. *Inflammation*, 1994. **18**(3): p. 323-35.
25. Dascal, N., *The use of Xenopus oocytes for the study of ion channels*. *CRC Crit Rev Biochem*, 1987. **22**(4): p. 317-87.
26. Dascal, N., et al., *Expression and modulation of voltage-gated calcium channels after RNA injection in Xenopus oocytes*. *Science*, 1986. **231**(4742): p. 1147-50.
27. Drake, J.G. and J.L. Becker, *Aspirin-induced inhibition of ovarian tumor cell growth*. *Obstet Gynecol*, 2002. **100**(4): p. 677-82.
28. Dumont, J.N., *Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals*. *J Morphol*, 1972. **136**(2): p. 153-79.
29. Durieux, M.E., *OoClamp: an IBM-compatible software system for electrophysiologic receptor studies in Xenopus oocytes*. *Comput Methods Programs Biomed*, 1993. **41**(2): p. 101-5.
30. Durieux, M.E., *Inhibition by ketamine of muscarinic acetylcholine receptor function*. *Anesth Analg*, 1995. **81**(1): p. 57-62.
31. Durieux, M.E. and G.W. Nietgen, *Synergistic inhibition of muscarinic signaling by ketamine stereoisomers and the preservative benzethonium chloride*. *Anesthesiology*, 1997. **86**(6): p. 1326-33.
32. Durieux, M.E., et al., *Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive Ca(2+)-activated Cl- current in Xenopus laevis oocytes*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 1): p. C896-900.
33. Dyer, D., G. Tigyi, and R. Miledi, *The effect of active serum albumin on PC12 cells: I. Neurite retraction and activation of the phosphoinositide second messenger system*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992. **14**(4): p. 293-301.
34. Eichholtz, T., et al., *The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets*. *Biochem J*, 1993. **291** (Pt 3): p. 677-80.
35. Erickson, J.R., et al., *Lysophosphatidic acid and ovarian cancer: a paradigm for tumorogenesis and patient management*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2001. **64**(1-4): p. 63-81.
36. Erickson, J.R., et al., *Edg-2/Vzg-1 couples to the yeast pheromone response pathway selectively in response to lysophosphatidic acid*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(3): p. 1506-10.

37. Falkowski, M., et al., *The effect of cyclooxygenase inhibitor diclofenac on experimental murine colon carcinoma*. Anticancer Res, 2003. **23**(3B): p. 2303-8.
38. Fang, X., et al., *Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 257-64.
39. Ferguson, J.E. and M.R. Hanley, *Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid stimulate receptor-regulated membrane currents in the Xenopus laevis oocyte*. Arch Biochem Biophys, 1992. **297**(2): p. 388-92.
40. Fernhout, B.J., et al., *Lysophosphatidic acid induces inward currents in Xenopus laevis oocytes; evidence for an extracellular site of action*. Eur J Pharmacol, 1992. **213**(2): p. 313-5.
41. Fukushima, N., Y. Kimura, and J. Chun, *A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6151-6.
42. Furst, D.E., et al., *A strategy for reaching therapeutic salicylate levels in patients with rheumatoid arthritis using standardized dosing regimens*. J Rheumatol, 1987. **14**(2): p. 342-7.
43. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 615-49.
44. Goodnight, S.H., *Antiplatelet therapy with aspirin: from clinical trials to practice*. Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 401-5.
45. Goodnight, S.H., *Aspirin therapy for cardiovascular disease*. Curr Opin Hematol, 1996. **3**(5): p. 355-60.
46. Gundersen, C.B., R. Miledi, and I. Parker, *Slowly inactivating potassium channels induced in Xenopus oocytes by messenger ribonucleic acid from Torpedo brain*. J Physiol, 1984. **353**: p. 231-48.
47. Guo, Z., et al., *Molecular cloning of a high-affinity receptor for the growth factor-like lipid mediator lysophosphatidic acid from Xenopus oocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14367-72.
48. Gupta, R.A. and R.N. DuBois, *Aspirin, NSAIDS, and colon cancer prevention: mechanisms?* Gastroenterology, 1998. **114**(5): p. 1095-8.
49. Gurdon, J.B., et al., *Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells*. Nature, 1971. **233**(5316): p. 177-82.
50. Gurdon, J.B., D.A. Melton, and E.M. De Robertis, *Genetics in an oocyte*. Ciba Found Symp, 1979(66): p. 63-80.
51. Harden, T.K., *G-protein-regulated phospholipase C. Identification of component proteins*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1992. **26**: p. 11-34.
52. Harris, R.E., et al., *Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review)*. Oncol Rep, 2005. **13**(4): p. 559-83.
53. Hecht, J.H., et al., *Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex*. J Cell Biol, 1996. **135**(4): p. 1071-83.
54. Hille, B., *Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors*. Trends Neurosci, 1994. **17**(12): p. 531-6.
55. Hodgkin, A.L., A.F. Huxley, and B. Katz, *Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 424-48.

56. Hollmann, M.W., et al., *Inhibition of mammalian Gq protein function by local anesthetics*. Anesthesiology, 2002. **97**(6): p. 1451-7.
57. Hollmann, M.W., et al., *Local anesthetic inhibition of G protein-coupled receptor signaling by interference with Galpha(q) protein function*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(2): p. 294-301.
58. Honemann, C.W., et al., *Volatile and local anesthetics interfere with thromboxane A2 receptors recombinantly expressed in Xenopus oocytes*. Adv Exp Med Biol, 1999. **469**: p. 277-83.
59. Honemann, C.W., et al., *Partition coefficients of volatile anesthetics in aqueous electrolyte solutions at various temperatures*. Anesthesiology, 1998. **89**(4): p. 1032-5.
60. Houamed, K.M., et al., *Expression of functional GABA, glycine and glutamate receptors in Xenopus oocytes injected with rat brain mRNA*. Nature, 1984. **310**(5975): p. 318-21.
61. Hu, Y.L., et al., *Dual mechanisms for lysophosphatidic acid stimulation of human ovarian carcinoma cells*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(10): p. 733-40.
62. Iglauer F., D.J., Hilken G., *Tierschutzgerechte Haltung von Wasserfröschen ("rana esculenta") und südafrikanischen Krallenfröschen (xenopus laevis)*. 1994.
63. Im, D.S., et al., *Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(4): p. 753-9.
64. in t' Veld, B.A., et al., *Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2001. **345**(21): p. 1515-21.
65. Ishii, I., et al., *Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(5): p. 895-902.
66. Jalink, K., et al., *Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action*. Cell Growth Differ, 1993. **4**(4): p. 247-55.
67. Jalink, K. and W.H. Moolenaar, *Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers*. J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 411-9.
68. Jorgensen, T.G., et al., *Salicylate- and aspirin-induced uncoupling of oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from the mucosal membrane of the stomach*. Scand J Clin Lab Invest, 1976. **36**(7): p. 649-54.
69. Karow, T; Lang, R.; *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2002. 10. Auflage 760.
70. Kay Brune, T.E., *Pharmazie in unserer Zeit. Die Entwicklung der antipyretischen Analgetika*. . Vol. 31(2). 2002. S. 133 - 139
71. Kolodney, M.S. and E.L. Elson, *Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contraction of fibroblasts*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23850-5.
72. Koolmann, J., Röhm, K.-H.; *Taschenatlas der Biochemie*. 2. Auflage 1998, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 500 Seiten.
73. Kuhnert, N., *Hundert Jahre Aspirin*. Chemie in unserer Zeit 33. 1999. S. 213 - 220

74. Lambert, D.G., *Signal transduction: G proteins and second messengers*. Br J Anaesth, 1993. **71**(1): p. 86-95.
75. Lapetina, E.G. and S.P. Watson, *Relative importance of diacylglycerol, phosphatidate, lysophosphatidate, inositol trisphosphate and arachidonate metabolism in platelet receptor signalling*. Nouv Rev Fr Hematol, 1985. **27**(4): p. 235-8.
76. Lechleiter, J.D. and D.E. Clapham, *Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *X. laevis* oocytes*. Cell, 1992. **69**(2): p. 283-94.
77. Lee, M.J., et al., *Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1552-5.
78. Liliom, K., et al., *Xenopus oocytes express multiple receptors for LPA-like lipid mediators*. Am J Physiol, 1996. **270**(3 Pt 1): p. C772-7.
79. Lim, G.P., et al., *Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2000. **20**(15): p. 5709-14.
80. Linder, M.E. and A.G. Gilman, *G proteins*. Sci Am, 1992. **267**(1): p. 56-61, 64-5.
81. Lu, J., et al., *Role of ether-linked lysophosphatidic acids in ovarian cancer cells*. J Lipid Res, 2002. **43**(3): p. 463-76.
82. Lynch, K.R., et al., *Structure/activity relationships in lysophosphatidic acid: the 2-hydroxyl moiety*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(1): p. 75-81.
83. Madeja, M. and U. Musshoff, *Die Eizelle des Krallenfrosches als Modell in der Neurophysiologie*. EEG-Labor, 1992. **14**: p. 25-37.
84. Madeja, M., U. Musshoff, and E.J. Speckmann, *A concentration-clamp system allowing two-electrode voltage-clamp investigations in oocytes of *Xenopus laevis**. J Neurosci Methods, 1991. **38**(2-3): p. 267-9.
85. Masu, Y., et al., *cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system*. Nature, 1987. **329**(6142): p. 836-8.
86. Masui, Y., *Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens**. J Exp Zool, 1967. **166**(3): p. 365-75.
87. Mertz, J.E. and J.B. Gurdon, *Purified DNAs are transcribed after microinjection into *Xenopus* oocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(4): p. 1502-6.
88. Methfessel, C., et al., *Patch clamp measurements on *Xenopus laevis* oocytes: currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels*. Pflugers Arch, 1986. **407**(6): p. 577-88.
89. Michell, R.H., *Inositol lipids in cellular signalling mechanisms*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(8): p. 274-6.
90. Miledi, R. and I. Parker, *Latencies of membrane currents evoked in *Xenopus* oocytes by receptor activation, inositol trisphosphate and calcium*. J Physiol, 1989. **415**: p. 189-210.
91. Miledi, R. and R.M. Woodward, *Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes*. J Physiol, 1989. **416**: p. 601-21.
92. Moolenaar, W.H., *Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 12949-52.
93. Moolenaar, W.H., *Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 230-8.
94. Moolenaar, W.H., et al., *Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 168-73.

95. Morris, J.C., et al., *Phosphatidylinositol phospholipase C is activated allosterically by the aminoglycoside G418. 2-deoxy-2-fluoro-scylo-inositol-1-O-dodecylphosphonate and its analogs inhibit glycosylphosphatidylinositol phospholipase C*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15468-77.
96. Nagata, A., et al., *G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11825-30.
97. Nietgen, G.W., C.K. Chan, and M.E. Durieux, *Inhibition of lysophosphatidate signaling by lidocaine and bupivacaine*. Anesthesiology, 1997. **86**(5): p. 1112-9.
98. Nietgen, G.W. and M.E. Durieux, *Intercellular signaling by lysophosphatidate*. Cell Adhes Commun, 1998. **5**(3): p. 221-35.
99. Nietgen, G.W., C.W. Honemann, and M.E. Durieux, *Influence of anesthetics on endogenous and recombinantly expressed G protein-coupled receptors in the Xenopus oocyte*. Toxicol Lett, 1998. **100-101**: p. 319-27.
100. Pancrazio, J.J., *PCS: an IBM-compatible microcomputer program for the analysis and display of voltage-clamp data*. Comput Methods Programs Biomed, 1993. **40**(3): p. 175-80.
101. Parys, J.B., et al., *Isolation, characterization, and localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor protein in Xenopus laevis oocytes*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18776-82.
102. Piazza, G.A., J.L. Ritter, and C.A. Baracka, *Lysophosphatidic acid induction of transforming growth factors alpha and beta: modulation of proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes and mouse skin*. Exp Cell Res, 1995. **216**(1): p. 51-64.
103. Rao, C.V. and B.S. Reddy, *NSAIDs and chemoprevention*. Curr Cancer Drug Targets, 2004. **4**(1): p. 29-42.
104. Rich, J.B., et al., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease*. Neurology, 1995. **45**(1): p. 51-5.
105. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
106. Rosenberg, L., C. Louik, and S. Shapiro, *Nonsteroidal antiinflammatory drug use and reduced risk of large bowel carcinoma*. Cancer, 1998. **82**(12): p. 2326-33.
107. Shida, D., et al., *Lysophosphatidic acid (LPA) enhances the metastatic potential of human colon carcinoma DLD1 cells through LPA1*. Cancer Res, 2003. **63**(7): p. 1706-11.
108. Shimamoto, J., et al., *Lack of differences in diclofenac (a substrate for CYP2C9) pharmacokinetics in healthy volunteers with respect to the single CYP2C9*3 allele*. Eur J Clin Pharmacol, 2000. **56**(1): p. 65-8.
109. Shiraishi, M., et al., *Inhibition by tramadol of muscarinic receptor-induced responses in cultured adrenal medullary cells and in Xenopus laevis oocytes expressing cloned M1 receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(1): p. 255-60.
110. Siess, W., et al., *Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6931-6.

111. Sigel, E., *Use of Xenopus oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins*. J Membr Biol, 1990. **117**(3): p. 201-21.
112. Snutch, T.P., *The use of Xenopus oocytes to probe synaptic communication*. Trends Neurosci, 1988. **11**(6): p. 250-6.
113. Soreq, H. and S. Seidman, *Xenopus oocyte microinjection: from gene to protein*. Methods Enzymol, 1992. **207**: p. 225-65.
114. Stuhmer, W., *Structure-function studies of voltage-gated ion channels*. Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1991. **20**: p. 65-78.
115. Sullivan, L.M., et al., *Synergistic inhibition of lysophosphatidic acid signaling by charged and uncharged local anesthetics*. Anesth Analg, 1999. **88**(5): p. 1117-24.
116. Tavani, A., et al., *Aspirin and ovarian cancer: an Italian case-control study*. Ann Oncol, 2000. **11**(9): p. 1171-3.
117. Tigyi, G. and R. Miledi, *Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in Xenopus oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21360-7.
118. Timpe, L.C., et al., *Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in Xenopus oocytes*. Nature, 1988. **331**(6152): p. 143-5.
119. Tokumura, A., K. Fukuzawa, and H. Tsukatani, *Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species*. Lipids, 1978. **13**(8): p. 572-4.
120. Tokumura, A., et al., *Stimulatory effect of lysophosphatidic acids on uterine smooth muscles of non-pregnant rats*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1980. **245**(1): p. 74-83.
121. Tokumura, A., et al., *Lysophosphatidic acids induce contraction of rat isolated colon by two different mechanisms*. J Pharm Pharmacol, 1991. **43**(11): p. 774-8.
122. Van Brocklyn, J.R., et al., *Sphingosine-1-phosphate is a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-6*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2624-9.
123. van Corven, E.J., et al., *Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins*. Cell, 1989. **59**(1): p. 45-54.
124. van der Bend, R.L., et al., *Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid*. Embo J, 1992. **11**(7): p. 2495-501.
125. Vane, J.R., *Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs*. Nat New Biol, 1971. **231**(25): p. 232-5.
126. Vane, J.R. and R.M. Botting, *Mechanism of action of antiinflammatory drugs*. Int J Tissue React, 1998. **20**(1): p. 3-15.
127. Xu, Y., et al., *Unfolding the pathophysiological role of bioactive lysophospholipids*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2003. **3**(1): p. 23-32.
128. Zandi, P.P. and J.C. Breitner, *Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(6): p. 811-7.
129. Zhang, G., et al., *Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate*. Gene, 1999. **227**(1): p. 89-99.
130. Zondag, G.C., et al., *Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 2): p. 605-9.

131. Zurier, R.B. and F. Quagliata, *Effect of prostaglandin E 1 on adjuvant arthritis*. Nature, 1971. **234**(5327): p. 304-5.



Bezirksregierung Münster

Verwaltungsbereich 40125 Münster

Herrn Prof. Dr. med. W. Schmits
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Westf. Wilhelms-Universität Münster
Domagkstr. 12
48125 Münster

Domagkstraße
Komplex 1-5
Telefon (0251) 41012
Durchwahl 1112
Eingang 433
Post 10100
Öffnungszeiten
20.00 bis 22.00 Uhr (jeweils)

6. Juni 2000

Herrn Prof. Dr. med. H. Van Aken
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin
Albert-Schweitzer-Str. 33
48129 Münster

Betr.: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren;

hierzu: Anzeige von Versuchsvorhaben gemäß § 10a Tier-
schutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Be-
kanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBI. I, S. 1195)
Versuchsvorhaben:

"Untersuchungen von Membranproteinen (G-Protein-
gekoppelte Rezeptoren - GPR, Liganden - und
Spannungs - kontrollierte Ionenkanäle) und deren
Beeinflussung durch Anästhetika"

Bezug: Ihr Antrag auf Genehmigung von Versuchsvorhaben gemäß
§ 8 Abs. 1 TierSchG vom 12.03. 2000, hier eingegangen
am 03.04.2000

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmits,
sehr geehrter Herr Prof. Dr. Van Aken,

ich habe Ihren o.a. Antrag geprüft und festgestellt, dass das
von Ihnen geplante Versuchsvorhaben nicht genehmigungspflichtig
nach § 8 TierSchG ist, sondern unter die Bestimmung des § 10a
TierSchG fällt und somit lediglich anzeigepflichtig ist.

Die geplanten Eingriffe und Behandlungen dürfen jedoch nur
vorgenommen werden, wenn die Voraussetzungen des § 7 Abs. 2 und
3 (zulässiger Verwendungszweck, Unverletzlichkeit, ethische
Vertretbarkeit) vorliegen.

Erstes Verwaltungsdezernat: 0251 410-100
Telefon: 0251 410-100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000

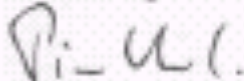
Da nach Ihren Antragsangaben auf das Vorliegen der genannten Voraussetzungen geschlossen werden kann, bestätige ich gemäß § 10a TierSchG das o.a. Versuchsvorhaben.

Das Versuchsvorhaben läuft jetzt unter der Nummer A 40/2000.

Herr Dr. Lücke als zuständiger Tierschutzbeauftragter und die Stadt Münster - Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt - (Erlaubnisbehörde gemäß § 11 TierSchG) erhalten jeweils eine Durchschrift dieser Bestätigung.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Piontkowski

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die eidesstattliche Erklärung ab, dass ich meine Dissertation über

Die Wirkung Nichtsteroidaler Antiphlogistika
auf die G-Protein-Kaskade

In der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
des Universitätsklinikums Münster

Unter Anleitung von
Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr.h.c. Hugo Van Aken, FRCA, FANZA

1. selbstständig angefertigt,
2. weder in der gegenwärtigen, noch in einer anderen Fassung als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt,
3. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
4. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 17.10.2007

Pia Rathmann
Kottwitzstrasse 4
20253 Hamburg

Danksagungen

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. med. Christian Hönemann, Herrn Priv.- Doz. Dr. Klaus Hahnenkamp und Herrn Prof. Dr. med. Hugo van Aken, die mir die Arbeit ermöglichten und mich hervorragend unterstützt haben.

Großer Dank gilt meinen Eltern, Petra und Rolf Rathmann, für ihre Geduld und Unterstützung.

Ganz lieben Dank auch Malte Rheingans für die Hilfe bei technischen Problemen, die unendliche Geduld sowie die ständige Ermutigung weiterzumachen.

Danke auch an Marie Nattermann und Britta Leckebusch für's Zuhören und die aufrichtenden Worte.

Herzlichen Dank an Frau Donay und Herrn Dr. Gumbinger für die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfe bei der Lösung chemischer Problemen.

Vielen Dank an Joke Nollet, Tobias Halene und Sascha Berning für die gute Einarbeitung und Zusammenarbeit sowie die entspannte Arbeitsatmosphäre.