

Linolsäureoxidation im Low-Density-Lipoprotein: ein wichtiger Faktor bei der Atherogenese**

Dieter Spiteller und Gerhard Spiteller*

Fast die Hälfte aller Todesfälle in Deutschland wird durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht,^[1] zum Teil als Folge der Ablagerung cholesterinreicher Plaques in den Arterien. Cholesterin, ein essentieller Bestandteil der Zellmembranen, wird den Zellen über das Low-Density-Lipoprotein (LDL) zugeführt. LDL besteht aus einem Lipidkern, der hauptsächlich Cholesterinester enthält. Diesen Kern umgibt eine Phospholipidschicht, die wiederum von einem Protein umhüllt wird. Dieses wird über Lysylreste von Zellrezeptoren erkannt, die sich in „coated pits“ auf der Zelloberfläche befinden. Das gesamte „coated pit“ wird mit dem am Rezeptor gebundenen LDL von einem Protein umschlossen und in das Zellinnere transportiert. Dort trennt sich das Protein vom Rezeptor, und LDL wird frei. In der Folge wird das LDL „verdaut“: Das Protein wird in Aminosäuren zerlegt, Cholesterinester und Phospholipide werden verseift. Je nach Bedarf an Cholesterin werden mehr oder weniger Rezeptoren gebildet.^[2, 3]

Oxidativ verändertes LDL^[4, 5] wird nicht mehr vom LDL-Zellrezeptor, sondern von „Scavenger“-Rezeptoren an Makrophagen erkannt, unbegrenzt aufgenommen^[2, 3] und schließlich als Plaques abgelagert. LDL ist sehr oxidationsempfindlich, die Oxidation erfolgt unter Kupfer(II)-Ionen-Katalyse an der Luft^[5, 6] oder selbst schon bei drei- bis sechsmonatiger Aufbewahrung bei 0 °C.^[7] Oxidiertes LDL (oxLDL) ist toxisch,^[4] die toxischen Verbindungen sind mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar.^[5] Dies legte den Verdacht nahe, dass es sich bei diesen toxischen Bestandteilen um Produkte der Lipidperoxidation (LPO) mehrfach ungesättigter Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) handeln könnte.^[4] Einige dieser Produkte wurden identifiziert,^[8, 9, 10] die meisten sind bisher unbekannt geblieben.

Da LPO-Produkte im Vergleich zu anderen Verbindungen im LDL nur in Spuren vorliegen, erfordert ihre Identifizierung eine sehr empfindliche und spezifische Nachweismethode. Substituierte Fettsäuren und daraus gebildete Produkte geben nach entsprechender Derivatisierung charakteristische Spektren bei der Elektronenstoß-Massenspektrometrie (electron impact mass spectrometry, EI-MS). Wir haben daher diese Methode zur Identifizierung der LPO-Produkte verwendet, die bei der durch Kupferionen induzierten LDL-Oxidation,^[5] aber auch bei Aufbewahrung von LDL bei 0 °C entstehen.^[7]

Reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden zunächst unter den gleichen Bedingungen, die wir später zur Oxidation

von LDL anwandten, unter Kupfer(II)-Ionen-Katalyse an der Luft bei 37 °C oxidiert. Die Lipidfraktion der Reaktionsprodukte wurde zur Derivatisierung von Carbonylgruppen mit Pentafluorbenzylhydroxylaminhydrochlorid umgesetzt.^[9] Freie Säuregruppen wurden durch kurzfristige Einwirkung von Diazomethan in Methylestergruppen überführt und dann vorhandene Hydroxygruppen mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) trimethylsilyliert. Das so erhaltene Produktgemisch wurde durch GC/MS unter Aufzeichnung des Totalionenstroms analysiert. Die nachgewiesenen Verbindungen erwiesen sich als qualitativ nahezu identisch mit LPO-Produkten, die schon früher^[11, 12] bei der Oxidation von PUFAs mit anderen Oxidationsmitteln (z. B. Fe³⁺/Luftsauerstoff) erhalten worden waren; allerdings beobachteten wir in verstärktem Maße die Bildung höher oxidierter Verbindungen (z. B. die Überführung von Aldehyden in Säuren). Die Kenntnis der so gewonnenen Spektren erleichterte das Auffinden analoger Produkte nach Luftoxidation von LDL-Proben. In Zeitabständen entnommene Proben gaben Hinweise auf den Reaktionsverlauf. Zur Erfassung veresterter oxidierter PUFAs war es allerdings notwendig, in das oben beschriebene Aufarbeitungsverfahren einen Hydrolyseschritt mit Cholesterin-Esterase einzubauen. In den Abbildungen 1–3 ist der zeitliche Verlauf der Oxidation einer LDL-Probe beispielhaft dargestellt.

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt aus dem rekonstruierten Ionenstrom-Chromatogramm (RIC) der betreffenden LDL-Probe vor der Oxidation. In Abbildung 2 ist das RIC derselben Probe nach 6-stündiger Oxidation, in Abbildung 3 nach 24-stündiger Oxidation reproduziert. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Qualitativ unterscheiden sich die RICs der LDL-Proben verschiedener Spender und käuflicher Proben nicht. Die Mengenverhältnisse der in LDL-Proben enthaltenen Säuren und ihrer Oxidationsprodukte sind dagegen individuell verschieden: Sie hängen stark von der Ernährungsweise des Probanden ab, ein hoher Spiegel an Linolsäure in der Nahrung verdoppelt bis verdreifacht die Menge an Oxidationsprodukten im LDL 12 bis 16 h nach Aufnahme einer linolsäurereichen Mahlzeit.^[13] 9-Hydroxy-10,12-octadecadiensäure (9-HODE) und 13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure (13-HODE) sind in Spuren bereits vor der LDL-Oxidation vorhanden (Abbildung 1), ein Zeichen dafür, dass selbst in gesunden Probanden in kleinem Maß eine Oxidation der Linolsäure stattfindet.

Die LDL-Oxidation beginnt nicht sofort, weil zuerst die vorhandenen Antioxidantien verbraucht werden.^[8] Diese Zeitspanne (Lag Time) hängt von der Menge zugesetzter Kupfer(II)-Ionen ab, sie ist aber auch individuell verschieden. Im vorliegenden Fall wurden erste Oxidationsprodukte nach sechsstündiger Inkubation (Abbildung 2) an einer Zunahme der Menge der HODE-Derivate (Peak 33) erkannt. Während 9-HODE und 13-HODE schon früher als LPO-Produkte bei der Kupferionen-induzierten LDL-Oxidation identifiziert wurden^[10] und auch stark angereichert im Blut von Atherosklerosepatienten vorliegen,^[14] waren Epoxyhydroxyoctadecensäuren (EphODs, Peak 37 und 38) sowie 9- und 13-Oxo-octadecadiensäuren (KODEs, Peak 35, 36 und 39) bisher noch nicht als Oxidationsprodukte von LDL beschrieben

[*] Prof. Dr. G. Spiteller, Dipl.-Chem. D. Spiteller
Lehrstuhl für Organische Chemie I der Universität
Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-552671
E-mail: gerhard.spiteller@uni-bayreuth.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Herrn W. Kern danken wir für die Herstellung der Diazomethanolösung.

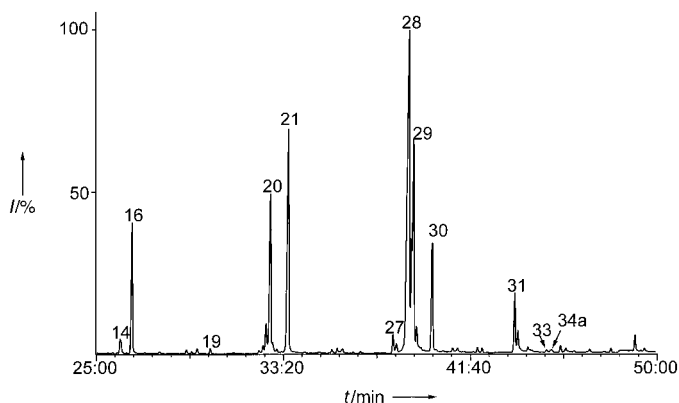


Abbildung 1. Ausschnitt eines RI-Chromatogramms der aus LDL erhaltenen Lipidfraktion eines 67-jährigen Mannes (Gesamtcholesterin 199 mg dL^{-1} , LDL-Cholesterin 127 mg dL^{-1} , HDL-Cholesterin 57 mg dL^{-1} , Triglyceride 71 mg dL^{-1}). Die Zahlen über den Peaks entsprechen den in Tabelle 1 angeführten Verbindungen.

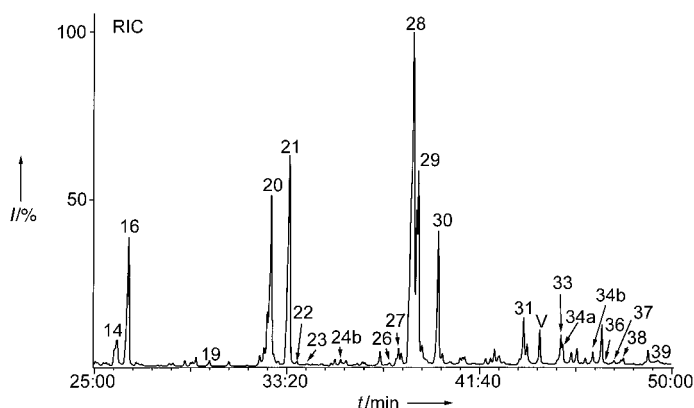


Abbildung 2. Ausschnitt eines RI-Chromatogramms der gleichen LDL-Probe wie in Abbildung 1 nach sechsständiger Oxidation ($5 \mu\text{M CuSO}_4$, Luftsauerstoff, 37°C). V = Verunreinigung.

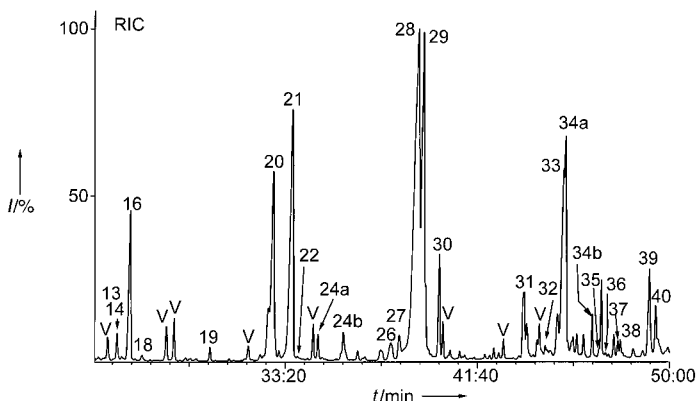


Abbildung 3. Teil des RI-Chromatogramms der gleichen LDL-Probe wie in Abbildung 1 nach 24-stündiger Oxidation. V = Verunreinigung.

worden. Ihr Auftreten ist bemerkenswert, weil Epoxide (unter Öffnung des Epoxidringes) und KODEs (im Zuge einer Michael-Reaktion) mit Nucleophilen (insbesondere Glutathion) reagieren und somit eine toxische Wirkung durch Blockierung SH-Gruppen-haltiger Enzyme entfalten könnten.

Innerhalb von 24 h änderte sich das Produktspektrum erheblich (Abbildung 3). Der Spiegel an Oxidationsprodukten, besonders der von HODEs (Peak 33, 34a und 34b) stieg gewaltig, aber auch die vermehrte Bildung von Aldehyden war nachweisbar, z. B. von 4-Hydroxy-2-nonenal^[15] (4-HNE; Peak 24a und 24b, zwei Isomere) oder von 2-Hydroxyheptanal (Peak 13).

Im Unterschied zu den typischen Produkten der Linolsäureoxidation (HODEs, KODEs, EpHODs) waren Oxidationsprodukte von Arachidonsäure, wie Hydroxyeicosatetraensäuren (Peak 40, mehrere Isomere), nur in geringer Menge vertreten. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil bisher angenommen wurde,^[3] dass bei der LPO von LDL vorwiegend Arachidonsäure angegriffen wird. Für die etwa gleichgroße Oxidationsneigung von Linol- und Arachidonsäure spricht auch die etwa gleichstarke Abnahme der diesen Säuren entsprechenden Peaks (Peak 28 und 31) in den Oxidationsansätzen.

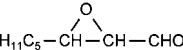
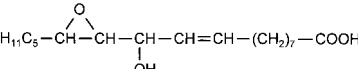
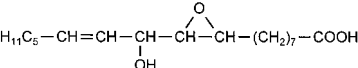
In kleiner Menge lassen sich nach 24-stündiger Oxidation auch Produkte der Ölsäureoxidation erkennen (Peak 32),^[10] die somit zeigen, dass ein oxidativer Angriff auch an nur monoallylisch aktivierten Methylengruppen erfolgt.

Das im Gegensatz zur bisherigen Meinung^[3] bevorzugte Auftreten von Produkten der Linolsäureoxidation ist verständlich, wenn man bedenkt, dass Radikale, die LPO-Prozesse einleiten, nur die Gruppierung $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ „sehen“. Sie greifen daher freie PUFAs und deren Ester mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit an. Der überwiegende Anteil von LDL besteht aus Linolsäurecholesterinester,^[16] Arachidonsäurecholesterinester liegt dagegen in viel geringerer Menge vor. Außerdem unterliegen LPO-Produkte der Arachidonsäure einem rascheren weiteren Abbau als jene der Linolsäure. Daher kommt es zu dem beobachteten Überwiegen von Produkten der Linolsäureoxidation.

HODEs, Hauptprodukte der LPO von LDL, sind physiologisch hochaktive Verbindungen: In Kombination mit anderen LPO-Produkten, z. B. 2,4-Decadienal, bewirken sie, dass Makrophagen Interleukin- 1β abgeben,^[17] sie aktivieren das „peroxisome proliferator-activated receptor protein“ (PPAR- γ),^[18] das bei der Zelldifferenzierung eine Rolle spielt,^[19] sie induzieren Entzündungsreaktionen^[20] und verursachen das Anschwellen von Mitochondrien.^[21] Toxische Eigenschaften werden vor allem 4-HNE zugeschrieben, das als α,β -ungesättigter Aldehyd Michael-Reaktionen eingeht;^[15, 22, 23] noch toxischer als 4-HNE ist 2,4-Decadienal,^[24] bedingt durch eine ausgedehntere Konjugation und damit eine höhere Reaktivität. Da das gleiche Strukturelement in KODEs vorhanden ist, sollten KODEs eine ähnlich toxische Wirkung entfalten. Dies wurde aber noch nicht untersucht.

Die Kupferionen-induzierte Oxidation von LDL ist eine unphysiologische Methode. Eine dem physiologischen Geschehen ähnliche milde Oxidation von LDL erfolgt dagegen bei Aufbewahrung von LDL-Proben in der Kälte.^[7] Dieses minimal oxidierte LDL (minimally modified LDL, MM-LDL) wird noch vom LDL-Zellrezeptor erkannt, aber nicht mehr vom Scavenger-Rezeptor.^[7] Wir haben solches MM-LDL aus einer Serumprobe, die 6 Monate bei 0°C gelagert wurde, gewonnen und in gleicher Weise wie das mit Luftsauerstoff/ Cu^{2+} -Ionen oxidierte LDL untersucht. Das Chro-

Tabelle 1. Fettsäureprodukte, die in LDL vor und nach Oxidation mit CuSO₄/Luftsauerstoff oder in minimal oxidiertem LDL identifiziert wurden.^[a]

Nr.	Herkunft (Angriffspunkt) ^[b]	Produkt	nachgewiesenes Derivat ^[c]	gefunden ^[d] in		
				LDL ^[e]	24 h	MM-LDL
				0 h	6 h	
1	LES (<i>n</i> -3)	H ₅ C ₂ -CHO	PFBO			+
2	AS (<i>n</i> -6), LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-COOH	TMS/OMe			+
3	AS (<i>n</i> -10), LS (<i>n</i> -10),	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -CHO				+
4	AS, LS	OHC-COOH	PFBO/OMe			+
5	AS, LS	H ₉ C ₄ -CHO	PFBO			+
6	AS, LS, LES	OHC-CH ₂ -COOH	PFBO/OMe			+
7	LS (<i>n</i> -10), LES (<i>n</i> -10)	HOOC-(CH ₂) ₆ -COOH	OMe/OMe			+
8	AS (<i>n</i> -6), LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CHO	PFBO			+
9	LES (<i>n</i> -3)	H ₅ C ₂ -CH(OH)-CHO	TMS/PFBO			+
10	AS (<i>n</i> -10), LS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-CH=CH-COOH	TMS/OMe			+
11		CH ₂ (OH)-CH(OH)-CHO	TMS/TMS/PFBO			+
12	LS (<i>n</i> -10), LES (<i>n</i> -10)	HOOC-(CH ₂) ₇ -COOH	OMe/OMe			+
13	AS (<i>n</i> -6), LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-CHO	TMS/PFBO		+	+
14		H ₂₅ C ₁₃ -COOH	OMe	+	+	+
15	LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CO-CH ₂ OH (Artefakt, Umlagerungsprodukt von 13)	TMS/PFBO			+
16		H ₂₇ C ₁₃ -COOH	OMe	+	+	+
17	AS (<i>n</i> -10), LS (<i>n</i> -10)		PFBO			+
18	LES (<i>n</i> -10)	H ₅ C ₂ -CH(OH)-CH=CH-CHO	TMS/PFBO			+
19		H ₂₉ C ₁₄ -COOH	OMe	+	+	+
20		H ₂₉ C ₁₅ -COOH	OMe	+	+	+
21		H ₃₁ C ₁₅ -COOH	OMe	+	+	+
22	AS, LS, LES	OHC-CHO	PFBO/PFBO			+
23	LS (<i>n</i> -10), LES (<i>n</i> -10)	OHC-(CH ₂) ₆ -COOH	PFBO/OMe			+
24	LS (<i>n</i> -10), AS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-CH=CH-CHO	TMS/PFBO		+	+
25	LS (<i>n</i> -10), AS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -CHO	PFBO		+	+
26	LS (<i>n</i> -10), LES (<i>n</i> -10)	OHC-(CH ₂) ₇ -COOH	PFBO/OMe		+	+
27		H ₃ C-(CH ₂ -CH=CH) ₃ -(CH ₂) ₇ -COOH	OMe	+	+	+
28		H ₃ C-(CH ₂) ₃ -(CH ₂ -CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₇ -COOH	OMe	+	+	+
29		H ₁₇ C ₈ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	OMe	+	+	+
30		H ₃₅ C ₁₇ -COOH	OMe	+	+	+
31		H ₉ C ₄ -(CH ₂ -CH=CH) ₄ -(CH ₂) ₃ -COOH	OMe	+	+	+
32	ÖS (<i>n</i> -9)	H ₁₇ C ₈ -CH=CH-CH(OH)-(CH ₂) ₆ -COOH	TMS/OMe			+
	ÖS (<i>n</i> -10)	H ₁₅ C ₇ -CH=CH-CH(OH)-(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/OMe			+
	ÖS (<i>n</i> -9)	H ₁₇ C ₈ -CH(OH)-CH=CH-(CH ₂) ₆ -COOH	TMS/OMe			+
	ÖS (<i>n</i> -10)	H ₁₅ C ₇ -CH(OH)-CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/OMe			+
33	LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-(CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/OMe	+	++	+++
34	LS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -CH(OH)-(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/OMe	+	++	+++
35	LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CO-(CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₇ -COOH	OMe			+
36	LS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -CO-(CH ₂) ₇ -COOH	OMe			+
37	LS (<i>n</i> -6)		TMS/OMe		+	++
38	LS (<i>n</i> -10)		TMS/OMe		+	++
39	LS (<i>n</i> -6), (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -C(OH)=CH-(CH ₂) ₆ -COOH H ₉ C ₄ -CH=C(OH)-(CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₇ -COOH	ETMS/OMe ETMS/OMe			+
40	AS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -CH(OH)-(CH ₂ -CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₃ -COOH	TMS/OMe			+
	AS (<i>n</i> -12)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH-CH ₂) ₂ -CH(OH)-(CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₃ -COOH	TMS/OMe			+
	AS (<i>n</i> -9)	H ₁₁ C ₅ -CH=CH-CH ₂ -CH(OH)-(CH=CH) ₂ -CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -COOH	TMS/OMe			+
	AS (<i>n</i> -13)	H ₁₁ C ₅ -CH=CH-CH ₂ -(CH=CH) ₂ -CH(OH)-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₃ -COOH	TMS/OMe			+
41	LS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -CH=CH-CH(OH)-CH(OH)-CH(OH)-(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/TMS/ TMS/OMe			+
42	LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-CH(OH)-CH=CH-CH(OH)-(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/TMS/TMS/OMe			+
43	LS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -CH(OH)-CH=CH-CH(OH)-CH(OH)-(CH ₂) ₇ -COOH	TMS/TMS/TMS/OMe			+
44	LS (<i>n</i> -10), AS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -CO-CH=CH-CHO	PFBO/PFBO			+
45	LS (<i>n</i> -6)	OHC-CH=CH-CH(OH)-(CH ₂) ₇ -COOH	PFBO/TMS/OMe			+
46	LS (<i>n</i> -6)	H ₁₁ C ₅ -CO-(CH=CH) ₂ -(CH ₂) ₇ -COOH	PFBO/OMe			+
47	LS (<i>n</i> -10)	H ₁₁ C ₅ -(CH=CH) ₂ -CO-(CH ₂) ₇ -COOH	PFBO/OMe			+

[a] Die Verbindungen sind nach steigender Elutionszeit der jeweils nachgewiesenen Derivate bei der Gaschromatographie aufgeführt; die Nummer entspricht den Peaks in Abbildung 1–3. Die Herkunft der einzelnen Verbindungen, ihre Strukturformeln und die Form ihrer Derivate sind in eigenen Spalten angegeben. [b] AS = Arachidonsäure, LES = Linolensäure, LS = Linolsäure, ÖS = Ölsäure. Der Angriffspunkt bezieht sich auf die Nummer des Kohlenstoffatoms der Ausgangsverbindung, wobei vom endständigen C-Atom (*n*) ausgehend gezählt wird. [c] ETMS = Enoltrimethylsilylester, OMe = Methyllester, PFBO = Pentafluorbenzoyloxim, TMS = Trimethylsilylether. [d] Die Abstufung von + zu +++ spiegelt die relativen Mengenverhältnisse wider. [e] Die Dauer der Oxidation (Cu²⁺/O₂) ist angegeben.

matogramm ähnelte dem einer etwa 10 h lang oxidierten LDL-Probe. Da dieses MM-LDL vom LDL-Rezeptor noch erkannt wird,^[7] sollte es in die Zelle gelangen und dort „verdaut“ werden (siehe oben). Also müssen HODEs, KODEs, EpHODs, 4-HNE und 2,4-Decadienal auch in die Zelle eingeschleust werden. Dies würde erklären, weshalb die Entwicklung der „fatty streaks“ (erstes Zeichen einer beginnenden Atherosklerose) unterhalb eines strukturell intakten Endothels erfolgt.^[25] Im Gegensatz dazu herrschte bisher die Meinung vor, dass das LDL bei Atherosklerose durch längeres Verweilen an der Endotheloberfläche von Zellen oxidiert würde, die auf unbekannte Weise ein Oxidationspotential erlangen könnten.^[26]

Der Anstieg der HODE-Werte erfolgt Jahre, bevor erste Anzeichen einer atherosklerotischen Veränderung in den Arterien zu beobachten sind,^[27] also auch bevor oxidiertes LDL vom Scavenger-Rezeptor der Makrophagen erkannt wird. Wir fanden in Modellversuchen, dass lipidhaltige Peptide, die für die Erkennung von LDL durch seine Rezeptoren verantwortlich sind, sehr viel weniger leicht oxidierbar sind als PUFA. Aus unseren Untersuchungen ist daher der Schluss zu ziehen, dass eine Atherosklerose mit einer vermehrten Oxidation des PUFA-Anteils von Cholesterinestern und Phospholipiden beginnt. Der Anstieg des Cholesterinspiegels bei Atherosklerose ist daher nur ein Nebeneffekt der viel wichtigeren Oxidation des Fettsäureteils. Dieser Anstieg übertrifft den des Cholesterins um mehr als eine Größenordnung.^[14]

Experimentelles

Aus Blutproben gesunder Probanden wurde unmittelbar nach der Entnahme Serum hergestellt und daraus LDL nach Leiß^[28] gewonnen. Weiterhin wurde LDL käuflich erworben (Fluka). MM-LDL wurde aus Serumproben hergestellt,^[28] die 3–6 Monate bei 0°C gelagert worden waren.^[7]

Oxidation von LDL: Eine aus 40 mL Serum erhaltene LDL-Probe wurde in 20 mL Phosphat-Puffer (0.1M, pH 7.4) gelöst. Dieser Lösung wurden 20 mL einer 10 µM wässrigen CuSO₄-Lösung zugefügt. Diese Lösung wurde an der Luft bei 37°C gerührt. Nach 0, 6, 12 und 24 h wurden der Oxidationslösung Proben von je 10 mL entnommen. Diese wurden nach Bligh und Dyer^[29] extrahiert. Die organische Phase wurde mit 50 µL einer 0.05 mM methanolischen Pentafluorbenzylhydroxylaminhydrochlorid-Lösung versetzt. Nach 10 min Stehen wurde das Lösungsmittel im Vakuum bei Raumtemperatur entfernt. Der Rückstand wurde in 10 mL einer 0.1 mM PBS-Lösung (pH 7.4) im Ultraschallbad gelöst. 1 mg Cholesterinesterase (Fluka) wurde zugesetzt und die Lösung 1 h bei 37°C gerührt. Erst dann wurden noch vorhandene Hydroperoxidspuren durch Zugabe von 20 µL P(OCH₃)₃^[30] zerstört (P(OCH₃)₃ deaktiviert das Enzym). Nach der Hydrolyse wurde erneut nach Bligh und Dyer extrahiert, wobei die wässrige Phase mit konz. HCl auf pH 2 angesäuert wurde.^[29] Der Rückstand der Extraktion wurde in 5 mL einer Lösung von MeOH/H₂O (85:15) im Ultraschallbad gelöst. Zur Abtrennung von Cholesterin und Fetten wurde über eine vorher äquilibrierte RP-18-Kartusche filtriert. Das Methanol wurde im Vakuum entfernt, der wässrige Rückstand in ein Flachbodenglas überführt und konz. HCl bis zum Erreichen von pH 2 zugefügt. Dann wurde mit Diethylether extrahiert, die etherische Phase abgetrennt und der Diethylether anschließend mit einem N₂-Strom entfernt (Vorsicht: Wenn HCl nicht vollständig entfernt wird, werden Hydroxygruppen bei der anschließenden Diazomethanbehandlung in Methylethergruppen überführt). Der Rückstand wurde nun 2 min mit 0.5 mL einer 5-proz. Lösung von Diazomethan in Diethylether versetzt. Überschüssiges Diazomethan und das Lösungsmittel wurden mit einem N₂-Strom entfernt und der Rückstand mit 10 µL MSTFA trimethylsilyliert

(60 min, 40°C). Die so hergestellten Proben wurden mit GC/MS untersucht.

Die Oxidation von Linolsäure und Arachidonsäure wurde wie kürzlich beschrieben ausgeführt,^[31] allerdings wurde statt Fe-Ionen eine 5 µM CuSO₄-Lösung verwendet.

GC/MS: Finnigan MAT 95, 70 eV, verbunden mit einem HP-5890-Serie-II-Gaschromatograph, Fused-Silicagel-Säule, belegt mit DB 05 (J. & W. Scientific Instruments), innerer Durchmesser 0.25 mm, 30 m, H₂, Injektor-temperatur 280°C, Temperaturprogramm: 3 min isotherm bei 50°C, 4°C min⁻¹ bis 100°C, 3°C min⁻¹ bis 300°C, 10 min isotherm bei 300°C, Injektionsvolumen 0.6–3 µL.

Eingegangen am 21. Mai 1999,
veränderte Fassung am 16. September 1999 [Z13452]

- [1] Statistisches Bundesamt, Pressemitteilungen vom 15. Juli 1996, 22. Juli 1997 und 10. Sept. 1998 (<http://194.95.119.6/presse/deutsch/monat.htm>).
- [2] J. L. Goldstein, M. S. Brown, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 897–930.
- [3] M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 223–261.
- [4] D. W. Morel, J. R. Hessler, G. M. Chisolm, *J. Lipid Res.* **1983**, *24*, 1070–1076.
- [5] U. P. Steinbrecher, S. Parthasarathy, D. S. Leake, J. L. Witztum, D. Steinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3883–3887.
- [6] U. P. Steinbrecher, H. Zhang, M. Loughheed, *Free Radicals Biol. Med.* **1990**, *9*, 155–168.
- [7] J. A. Berliner, M. C. Territo, A. Sevanian, R. Soroush, J. A. Kim, B. Bamshad, M. Esterson, A. M. Fogelman, *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 1260–1266.
- [8] H. Esterbauer, G. Jürgens, O. Quehenberger, E. Koller, *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 495–509.
- [9] F. J. G. M. van Kuijk, A. N. Siakotos, L. G. Fong, R. J. Stephens, D. W. Thomas, *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 420–424.
- [10] T. Wang, W. G. Yu, W. S. Powell, *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 525–537.
- [11] H. W. Gardner, R. Kleiman, D. Weisleder, *Lipids* **1974**, *9*, 696–706.
- [12] E. N. Frankel, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 1908–1917.
- [13] C. Schwarz und G. Spiteller, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [14] W. Jira, G. Spiteller, W. Carson, A. Schramm, *Chem. Phys. Lipids* **1998**, *91*, 1–11.
- [15] H. Esterbauer, R. J. Schaur, H. Zollner, *Free Radicals Biol. Med.* **1991**, *11*, 81–128.
- [16] H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, G. Jürgens, *Free Radicals Biol. Med.* **1992**, *13*, 341–390.
- [17] C. E. Thomas, R. L. Jackson, D. F. Ohlweiler, G. Ku, *J. Lipid Res.* **1994**, *35*, 417–427.
- [18] L. Nagy, P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen, R. M. Evans, *Cell* **1998**, *93*, 229–240.
- [19] A. Chawla, E. J. Schwarz, D. D. Dimaculangan, *Endocrinology* **1994**, *135*, 798–800.
- [20] D. Moch, T. Schewe, H. Kuehn, D. Schmidt, P. Buntrock, *Biomed. Biochim. Acta* **1990**, *49*, 201–207.
- [21] G. A. Blondin, *Ann. N. Y. Acad. Sci. (Carriers Channels Biol. Syst.)* **1975**, *264*, 98–111.
- [22] K. Uchida, S. Toyokuni, K. Nishikawa, S. Kawakishi, H. Oda, H. Hiai, E. R. Stadtman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12487–12494.
- [23] S. Srivastava, A. Chandra, L.-F. Wang, W. E. Seifert, Jr., B. B. DaGue, N. H. Ansari, S. K. Srivastava, A. Bhatnagar, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10893–10900.
- [24] T. Kaneko, S. Honda, S. I. Nakano, M. Matsuo, *Chem. Biol. Interact.* **1987**, *63*, 127–137.
- [25] D. Steinberg in *Atherosclerosis Reviews 18* (Hrsg.: J. Stokes, M. Mancini), Raven, New York, **1988**, 1–23.
- [26] D. Steinberg, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20963–20966.
- [27] W. Jira, G. Spiteller, A. Schramm, *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *84*, 165–173.
- [28] O. Leiß, U. Murawski, H. Egge, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1979**, *17*, 619–625.
- [29] E. G. Bligh, W. J. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.
- [30] P. Spiteller, G. Spiteller, *Chem. Phys. Lipids* **1997**, *89*, 131–139.
- [31] P. Spiteller, G. Spiteller, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1392*, 23–40.