

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biomaterial

Für die Isolierung von menschlichen PMN wurde das Blut von gesunden Spendern des Klinikums Benjamin Franklin, Berlin zur Verfügung gestellt. Diese männlichen und weiblichen Spender im Alter zwischen 20 und 40 Jahren nahmen nach eigenen Angaben keine Medikamente ein.

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammen von folgenden Herstellern:

- Amersham Buchler (Braunschweig, D): (^{14}C)AA (52 Ci/mmol), Hyperfilm ECL luminescence detection film.
- Biomol (Hamburg, D): AA und NDGA.
- Braun (Köln, D): Heparin-Natrium, Natriumcitrat.
- Cayman (SPI-BIO, Massy Cedex,F): Kits zur quantitativen Bestimmung von LTB_4 .
- Packard (Gaithersburg, MA, USA): LDS cocktail Ultima Gold.
- Pharmacia (Freiburg, D): Dextran T-400 und Ficoll.
- Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D): Western Blotting ECL Luminol Reagents.
- Serva (Heidelberg, D): FURA-2/AM.
- Sigma Chemie (München, D): Triton X-100, Pepstatin A, Aprotinin, Leupeptin, PMSF, Nonidet P-40, NaCl, Tris-HCl, 10 % Glycerin, Na_3VO_4 , Cytochrom c, Superoxiddismutase.

Verwendete Aktivatoren und Inhibitoren:

- Biomol (Hamburg, D): 12-epi-SLD.

- Cayman (SPI-BIO, Massy Cedex, F): MAFP, BEL, ATFK und N-acetyl-S-geranylgeranyl-L-Cysteine.
- Dr. L. Marshall (SmithKline Beecham, King of Prussia, PA, USA): SB203347.
- Rhein-Pharma (Plankstadt, D): Propranolol.
- Sigma Chemie (München, D): fMLP, Ca²⁺-Ionophore A23187.

Alle anderen Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen der Reinheitsstufe „p.A.“ und stammen von Merck (Darmstadt, D). Die Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographieanalysen entsprachen der LiChrosolv-Qualität.

2.1.3 Pufferlösungen

- PBS (138 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HCO₃, 1,5 mM KH₂CO₃, 2,7 mM KCl; pH 7,4) Biochrom (Berlin, D).
- PBS* (138 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HCO₃, 1,5 mM KH₂CO₃, 2,7 mM KCl, 0,1 Vol.-% Glucose, 0,25 Vol.-% Rinderserumalbumin (BSA); pH 7,4) Biochrom (Berlin, D).
- SDS Gel-Laufpuffer : 0,1 M Tris HCL (pH 6,8), 0,2 M DTT (Sigma), 4 Vol.-% SDS, 0,2 Vol.-% Bromophenolblau (Sera), 20 Vol.-% Glycerin (Sigma).
- Lysepuffer für Westernblot: 145 mM NaCl, 20 mM Tris HCL (pH 7,4), 10 Vol.-% Glycerin, 5 mM EDTA (pH 8), 0,2 mM Na₃VO₄, 0,1 mM PMSF, 1 Vol.-% Nonidet P-40, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin.
- Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-HCL, 250 mM Glycin (pH 8,3), 0,1 Vol.-% SDS PBS.
- Blockungspuffer (TBS-TM): 5 Vol.-%-ige Lösung aus getrocknetem, nicht fetthaltigem Milchpulver in TBS und 0,05 Vol.-% Tween 20.

2.1.4 Geräte und Software

- F-4500 Messungssystem Software für intrazelluläre Kationen (Hitachi, München, D).
- DC-Kieselgelplatten (20 cm x 20 cm) Schichtdicke 0,25 mm (Merck, Darmstadt, D).
- Mikroplatten-Photometer (Molecular Devices, München, D)
- Mini-Gel Twin G42 and Maxigel G48 Elektrophoresekammern (Biometra, Göttingen, D).
- Nitrozellulosefilter (Millipore, Schwalbach, D).
- Schüttelwasserbad (Grant, Cambridge, GB).

- SoftMax Software (Molecular Devices, München, D).
- Spektralphotometer Typ F-400 (Hitachi, München, D).
- Szintillationsmeßgerät Typ LS 1801 (Beckmann Instruments, München, D).
- TLC Scanner (Berthold, Bad Wildburg, D).
- Zentrifuge (Heraeus Holding, Berlin, D).

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von humanen PMN aus peripherenvenösem Blut

Die Isolierung von PMN erfolgte nach der Beschreibung von Böyum et al [27]. Hierfür entnahm man 40–50 ml peripherenvenöses Blut durch Punktion einer Cubitalvene. Langsames und vorsichtiges Abnehmen des Blutes war notwendig, um eine Aktivierung der PMN zu vermeiden. Ein sofortiger Heparinzusatz (150 IE/ml Blut) verhinderte die Gerinnung. Das Blut wurde im Verhältniss von 3:2 mit PBS verdünnt. Jeweils 25 ml dieser Verdünnung wurden über Ficoll geschichtet und für 45 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. So entstanden folgende Phasen: unten der Erythrozytensediment, dicht darüber die PMN, als gelblicher Ring darüber die Lymphozyten, Monozyten und Blutplättchen und oben das Blutplasma (siehe Abb. 2.1).

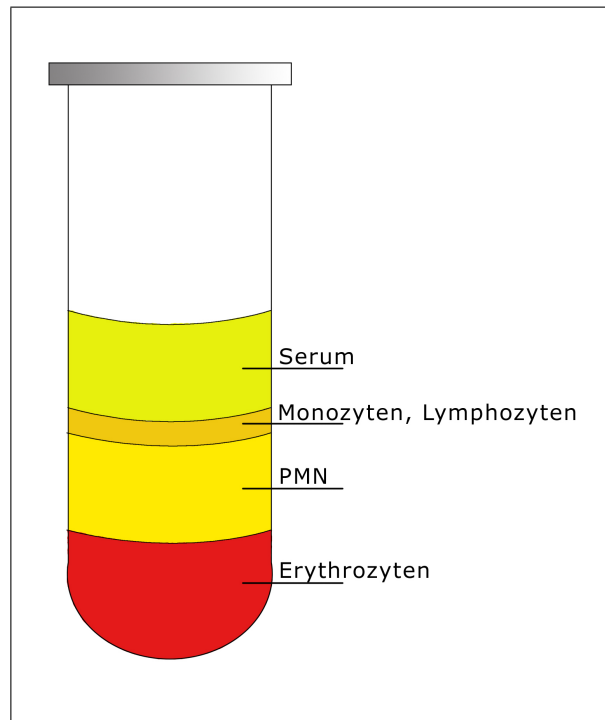


Abbildung 2.1: Schichtung der Blutzellen nach Zugabe von PBS, Schichtung über Ficoll und Zentrifugieren.

Plasma, Blutplättchen, Monozyten und Lymphozyten wurden vorsichtig abpipetiert und verworfen. Zur Trennung der PMN von den Erythrozyten wurde das verbleibende Zellsediment mit PBS und Dextranlösung (6 Vol.-% in PBS) im Verhältnis 3:2:1 versetzt und die Sedimentation der Erythrozyten für 40 Minuten bei Raumtemperatur abgewartet. Der Überstand wurde abgenommen, im Verhältnis 2:1 mit PBS verdünnt und 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands löste man das Zellsediment

vorsichtig und führte eine Lyse mit 24 ml H₂O durch, um die Lösung von verbliebenden Erythrozyten zu befreien, wobei die hypotone Hämolyse je nach Erythrozytenkontamination nach 20–30 Sekunden mit einer 8 ml 3,6 Vol.-%-igen NaCl Lösung und 8 ml PBS beendet wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 300 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment vorsichtig resuspendiert und in 2 ml PBS* aufgenommen.

Ein Aliquot der PMN-Suspension (10 µl, 1:50 verdünnt) wurde mit einer Trypanblaulösung (in PBS) angefärbt und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellfraktion bestand zu über 90 % aus PMN, die intakt und nicht mit Trypanblau anfärbbar waren. Anschließend wurden die Zellen auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^7$ PMN/ml mittels Zugabe von PBS* gebracht. Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen dienten vor und während der Versuche erneute lichtmikroskopische Kontrollen mit trypanblaugefärbten Zellen.

2.2.2 Intrazelluläre Kalziummessung

Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in den PMN erfolgte mittels einer spektrometrischen Bestimmungsmethode [183] durch Anfärbung mit fluoreszierendem FURA-2-Acetoxymethylester (FURA-2-AM). Die Konzentration der PMN wurde mittels PBS* auf $2 \cdot 10^7$ PMN/ml gebracht und für 40 Minuten mit 5 µM FURA-2AM im Schüttelwasserbad bei 37°C unter Lichtausschluß inkubiert. Zweimalig wurden die Zellen für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die PMN in 2 ml PBS* aufgenommen. So wurde die Lösung von nicht inkorporiertem FURA-2AM befreit. Danach folgte die Konzentrationseinstellung auf $5 \cdot 10^6$ /ml und die Lagerung der Zellen auf Eis.

Pro Experiment wurde 1 ml Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von $5 \cdot 10^6$ /ml verwendet. Dieser wurde mit 1,2 mM CaCl₂ und 1,0 mM MgCl₂ sowie Inhibitoren oder Aktivatoren versetzt und für 5 Minuten in einer Meßküvette unter Lichtausschluß equilibriert. Die Messung der Fluoreszenzen erfolgte in einem Spektralfluormeter, wobei die Fluoreszenzanregung bei 340 nm und 380 nm und die Emission bei 510 nm festgelegt waren. Während der gesamten Messung wurde ein Rührstab eingesetzt. 5 Sekunden nach Meßstart wurden 100 nM fMLP zugegeben. Nach 5 und 10 Minuten wurde eine nochmalige Stimulation der Zellen versucht. Das Experiment wurde beendet, indem 20 µl einer 10 Vol.-%-igen Triton X-100 Lösung und nach maximalem Anstieg der Fluoreszenzkurve 20 µl einer 5 mM MnCl₂-Lösung in die Meßküvette gegeben wurden. Die Meßzeit in diesem Experiment betrug insgesamt 15 Minuten.

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration konnte mit Hilfe der F-4500 Messungssystem Software für intrazelluläre Kationen bestimmt werden. Die Berechnung erfolgte nach der Formel

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

mit einem festgelegtem K_d von 224 nM [68]. Die maximale Fluoreszenz (F_{max}) entsprach dem Anstieg der Fluoreszenzkurve nach Zugabe der Triton X-100 Lösung durch Lyse der Zellen,

während die minimale Fluoreszenz (F_{min}) durch nachfolgende Zugabe von $MnCl_2$ ermittelt wurde.

2.2.3 Inkubation der PMN

Die Zellsuspension wurde mit PBS* auf $5 \cdot 10^6$ PMN/ml eingestellt und bei Raumtemperatur aufbewahrt, wobei die Lagerungsdauer 30 Minuten nicht überschritt. Dann wurde sie mit $0,25 \mu Ci/ml$ ($1,4 \mu M$) (^{14}C) AA für 20 Minuten in einem Schüttelwasserbad bei $37^\circ C$ inkubiert. Das Zellsediment wurde in PBS* resuspendiert und auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^6/ml$ gebracht. Die Zellexperimente wurden jeweils mit einem 1 ml Aliquot durchgeführt. Die PMN wurden für 5 Minuten mit $1,2 mM CaCl_2$ und $1,0 mM MgCl_2$ sowie Inhibitoren und/ oder Aktivatoren bei $37^\circ C$ vorinkubiert. Danach folgte die Zugabe des jeweiligen Stimulus und eine Inkubation für die jeweils gewählte Zeit. Inhibitoren und Aktivatoren waren in DMSO und Ethanol gelöst, wobei die Endkonzentration des Lösungsmittels im Zellansatz nie größer als $0,1 Vol.-%$ war und nachweislich keinen Effekt auf die untersuchte PMN-Funktion hatte. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von $3,8 ml$ Methanol/Chloroform/Essigsäure (2:1:0,04, Vol./Vol./Vol.) gestoppt.

2.2.4 Extraktion der AA und der 5-LOX-Metabolite

Die Extraktion erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer [22]. Dazu wurden zu jeder Probe $1 ml$ Chloroform und $1 ml$ Wasser gegeben und mit HCl ein pH-Wert von $3,9$ eingestellt. Die Proben wurden auf einem Rührer gemischt und anschließend für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Abnahme der Chloroformphase reextrahierte man die wässrige Phase mit $2 ml$ Chloroform und versetzte dann die Proben mit $1 ml H_2O$, zentrifugierte sie für 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute, engte sie unter N_2 ein und nahm sie abschließend in $20 \mu l$ Chloroform/Methanol (9:1, Vol./Vol.) auf.

2.2.5 Radiodünnschichtchromatographie

Für die Radiodünnschichtchromatographie wurden DC-Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von $0,25 mm$ benutzt. Vor Benutzung wurden die Platten in Ethanol gestellt und durch einstündige Inkubation bei $125^\circ C$ aktiviert. Fließmittel waren:

- n-Hexan/Diethylether/1N Essigsäure (50:50:1, Vol./Vol./Vol.) für die AA-Auftrennung,
- Chloroform/Methanol/1N Essigsäure/Wasser (90:7:1:0,7, Vol./Vol./Vol./Vol.) für die Auftrennung der 5-LOX-Metaboliten.

Die Extrakte und die entsprechenden Standards wurden bei Raumtemperatur über eine Laufstrecke von 18 cm aufgetrennt. Die Bahnbreite betrug 2 cm, die Randbahnen wurden nicht benutzt. Die Platten wurden zur Messung der AA-Freisetzung bei Raumtemperatur 20 Minuten getrocknet und in einer Jodkammer solange gelagert, bis die Standardsubstanzen sichtbar wurden. Für die Bestimmung der 5-LOX-Metabolite wurde die Platte eine Stunde bei 100°C inkubiert.

2.2.6 TLC-Scanner

Für die Radioaktivitätsverteilung der ¹⁴C-Metabolite wurde ein TLC-Scanner benutzt. Die Meßdauer der eindimensionalen Messung betrug pro Bahn 5 Minuten. Anhand der verwendeten Standards und Literaturangaben [137] wurden die Fraktionen identifiziert und durch Flüssigkeits-Szintillationsmessung quantitativ bestimmt.

2.2.7 LTB₄-Messung mit ELISA

Die Messung der LTB₄-Freisetzung in fMLP stimulierten PMN wurde mittels des Enzym Immunoassay KITS durchgeführt. Verwendet wurden 1:10 und 1:50 Verdünnungen der Extrakte. Die Vorgehensweise entsprach dem Firmenprotokoll. Anhand der ermittelten Standardkurve konnten die Proben quantifiziert werden.

2.2.8 Flüssigkeits-Szintillationsmessung

Das Kieselgel der ¹⁴C-markierten Proben wurde von der Platte abgenommen und in 10 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationsmeßgerät. Die einzelnen Fraktionen wurden durch Vergleich ihrer Laufzeit mit authentischen Standardverbindungen identifiziert. Zur quantitativen Bestimmung wurden die Zählimpulse pro Minute (cpm) herangezogen.

2.2.9 Produktion von Superoxidanionen (O₂⁻)

O₂⁻-Produktion ist durch Reduktion von Cytochrom c spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Mikroplatten-Photometer bestimmbar. Die Methode stammt von Pick [28]. Die PMN wurden auf eine Konzentration von 5 · 10⁶/ml mit PBS* gebracht und während des Experiments auf Eis gelagert. Pro Versuch wurde ein Aliquot von 125 µl entnommen und 5 Minuten mit 1,2 mM CaCl₂ und 1,0 mM MgCl₂ sowie den Testsubstanzen auf einem 37°C warmen Thermoblock inkubiert. Die Aktivierung erfolgte durch Zugabe von fMLP und Cytochrom c, das während des gesamten Experiments unter Lichtausschluß verwahrt wurde. Bei

der Hälfte der Versuche wurde außerdem Superoxiddismutase (SOD) zugefügt. Die Reaktionskinetik wurde in einem Intervall von 10 Sekunden bis 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 550 nm unter Lichtausschluß gemessen. Berechnen konnte man die O_2^- -Produktion mit Hilfe des SoftMax Programms, das die maximale optische Dichte (OD) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (VD) errechnet.

2.2.10 Westernblot

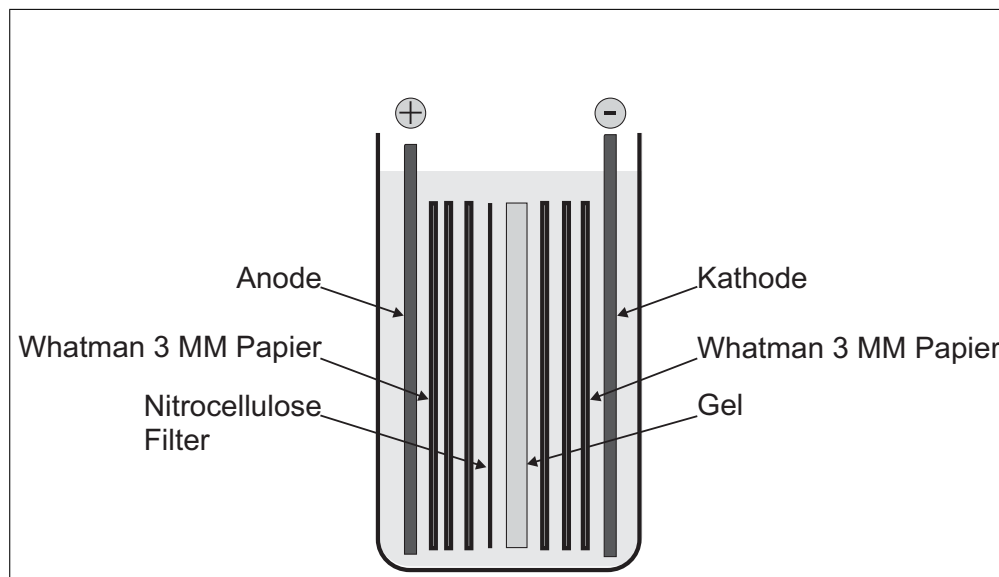


Abbildung 2.2: Anordnung von Blottingpapier, Gel und Nitrozellulose zwischen den Elektroden. Gel, Blottingpapier und Nitrozellulose wurden genau auf die Größen zugeschnitten, die für den Blot erforderlich waren (siehe Kapitel 2.2.10).

Die Methode des Westernblots wurde dem Molecular Cloning Manual [150] entnommen. Die PMN wurden aus Spenderblut, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, gewonnen und auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^7$ /ml mit PBS* gebracht. Jeweils 1 ml der Suspension wurde in Zentrifugenröhrchen gefüllt und 5 Minuten mit 1,2 mM $CaCl_2$ und 1,0 mM $MgCl_2$ im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Aktivierung erfolgte mit 100 nM fMLP durch 5-minütige Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die Röhrchen wurden für 5 Sekunden bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, dann wurde 1 ml eiskalter Lysepuffer zugegeben. Die Resuspension der Proteine erfolgte mit Hilfe des Schüttlers und einstündiger Inkubation auf Eis. Zentrifugieren (3500 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten) mit anschließendem Abpipettieren des Puffers ermöglichte die Trennung der Lösung von großen, ungelösten Proteinen. Vor der Elektrophorese wurden die Proben 5 Minuten im Wasserbad bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte für iPLA₂ und cPLA₂ mit einem 10 Vol.-%-igen SDS-PAGE Gel nach dem Molecular Cloning Handbuch. Ein halbtrockener Elektrobplot diente dem Transfer der Proteine vom

Gel auf einen Nitrozellulosefilter. Dazu wurde ein Sandwich hergestellt, das aus Filter und Gel, flankiert von jeweils drei Whatman 3MM Papieren, bestand und zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden gebracht (siehe Abbildung 2.2). Die Transferzeit ist abhängig von der Größe der Proteine und betrug in diesem Fall 2 Stunden bei $0,65 \times \text{cm}^2$ mA. Das Filterpapier wurde anschließend getrocknet und mit Blockungspuffer versetzt (TBS-TM). Nun wurde auf einem Plattformschüttler eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe der Antikörper erfolgte in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ in einer frischen TBS-TM-Lösung, wobei das Volumen $0,1 \text{ ml}$ pro cm^2 betrug. Inkubiert wurde wieder eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler. Die Antikörperlösung wurde dann verworfen und der Filter dreimalig mit TBS-TM-Puffer versetzt, für 10 Minuten inkubiert und die Lösung verworfen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper in einer Konzentration von 1:3000 in TBS-TM zugegeben und der Filter wiederum eine Stunde inkubiert. Danach folgte eine zweimalige Inkubation des Filters mit TBS-TM für 10 Minuten mit Verwerfen der Lösung. Entwickelt wurde der Blot auf einem Röntgenfilm mit Hilfe der ELC-Reagenzien nach Anleitung der Bezugsfirma Santa Cruz.

2.2.11 Statistik

Die Daten wurden, wenn im Versuch nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) von jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Der Effekt der verschiedenen geprüften Substanzen wurde in Prozent der Kontrolle dargestellt:

$$\frac{\text{Substanz} - \text{Kontrolle}}{\text{Kontrolle}} \cdot 100$$

Die Kontrolle ergab sich aus der Differenz der Mengen der nach 5 Minuten gebildeten Substanz in An- und Abwesenheit von fMLP.