

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
Technik und Umwelt

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 5757

**Der Einfluß von organischen  
Blei- und Zinnverbindungen  
auf die Signaltransduktion  
*in vitro*:**

**Untersuchungen zur Veränderung  
der zytosolischen freien Calcium-  
konzentration**

**T. Ade**

Institut für Toxikologie

März 1996

---



**Forschungszentrum Karlsruhe**

**Technik und Umwelt**

**Wissenschaftliche Berichte**

**FZKA 5757**

**Der Einfluß von organischen Blei- und Zinnverbindungen  
auf die Signaltransduktion *in vitro*: Untersuchungen zur Veränderung  
der zytosolischen freien Calciumkonzentration**

**Thomas Ade**

**Institut für Toxikologie**

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der Universität Karlsruhe genehmigte  
Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

1996

Als Manuskript gedruckt  
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH  
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0947-8620

---

## **Der Einfluß von organischen Blei- und Zinnverbindungen auf die Signaltransduktion *in vitro*: Untersuchungen zur Veränderung der zytosolischen freien Calciumkonzentration**

### **Zusammenfassung:**

Die zellulären Wirkungsmechanismen organischer Blei- und Zinnverbindungen sind zum großen Teil nicht verstanden. Die immuno- und neurotoxischen Effekte dieser Xenobiotika lassen jedoch die Beeinflussung der Signalwege in den Zellen vermuten. Daher lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung der Signalübertragungswege und der damit verbundenen Regulation des Calciums.

Sowohl in immunkompetenten Zellen (HL-60) wie auch in neuronalen Zellen (NG108-15) induzierten die untersuchten Organometalle eine persistente Erhöhung der zytosolischen freien Calciumkonzentration. Mechanistische Studien mit EGTA, dem Calciumkanalblocker Nickel und der Untersuchung der intrazellulären Speicher in den HL-60 Zellen ergaben, daß ausschließlich das extrazelluläre Calcium für den organometall-induzierten Anstieg der zytosolischen freien Calciumkonzentration verantwortlich ist. Die Bleiverbindungen sowie das Tributylzinn führten zur Öffnung von Calciumkanälen in der Plasmamembran. Die Experimente mit den NG108-15 Zellen belegen diese Ergebnisse. Durch den Einsatz von Mangan ( $Mn^{2+}$ ) und Verapamil wurde nachgewiesen, daß der von Triethylblei und Tributylzinn induzierte Calciuminflux auch hier durch Calciumkanäle erfolgt.

Während bestimmte rezeptor-aktivierte Signalwege durch die Organometalle nicht induziert werden, konnte die Hemmung von  $Ca^{2+}$ -ATPasen ebenfalls beschrieben werden.

Die von ihrer Struktur abhängige Wirkung der Blei- und Zinnverbindungen resultierte in calcium-vermittelten Folgereaktionen, wie der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> oder eventuell der Induktion der Apoptose.

Die durch die Metallverbindungen veränderte Regulation der zytosolischen freien Calciumkonzentration war auch von anderen Ionengradienten an der Plasmamembran, wie  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , oder  $H^+$  abhängig.

Mit dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Aufklärung der biochemischen Mechanismen und zum Verständnis der zellschädigenden Wirkung von Organometallen geleistet.

## **The effect of organolead and -tin compounds on signal transduction *in vitro*: Investigations on the cytosolic free calcium concentration.**

### **Abstract:**

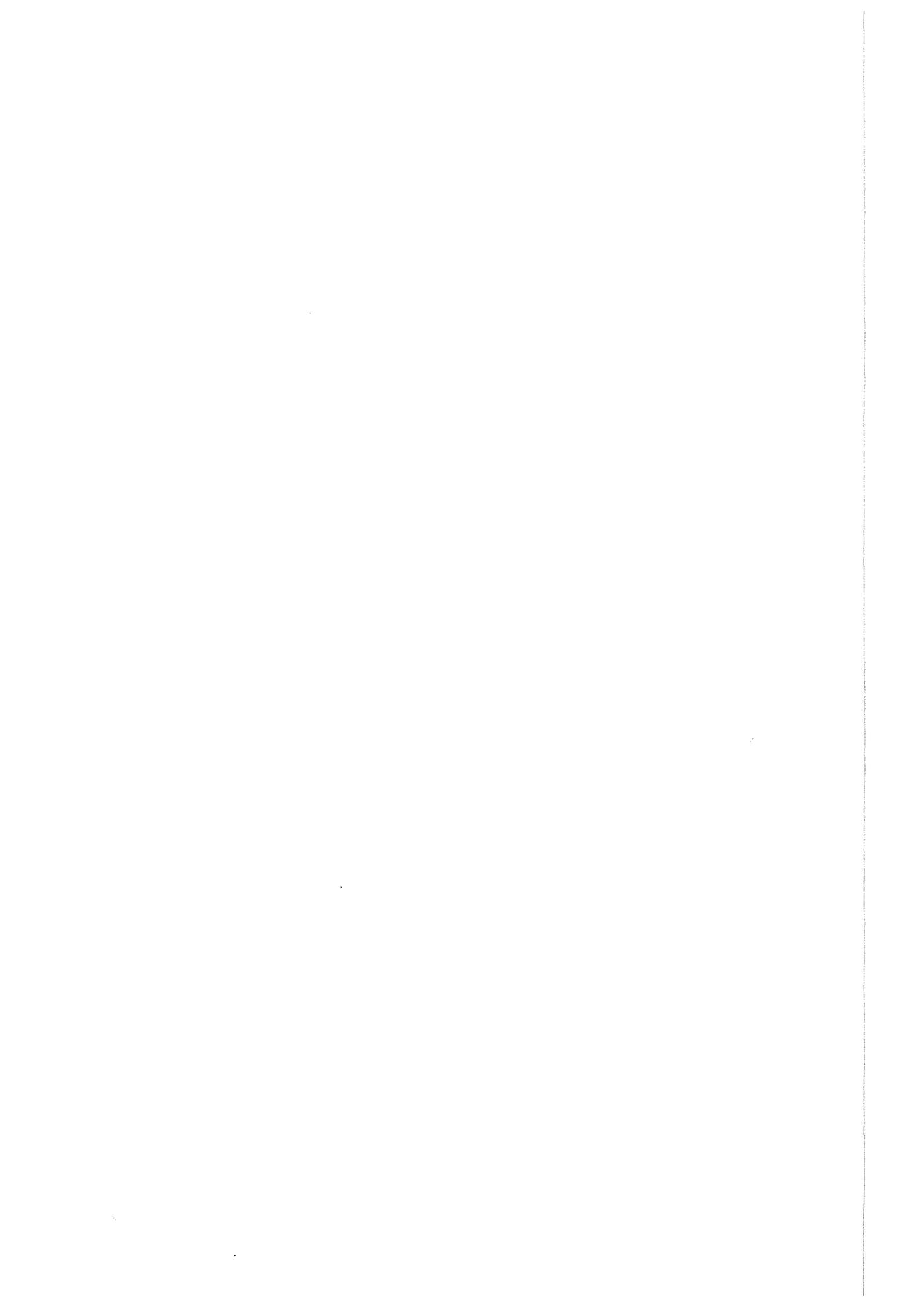
The cellular effects of organolead and -tin compounds are not yet precisely understood. However, on the basis of their immuno- and neurotoxicity it is most likely that these substances interfere with cellular signal transduction. For this reason the effect on cytosolic free calcium concentration was investigated in this study.

The organometals used induce a persistent increase in cytosolic free calcium concentration in human leukaemia HL-60 cells as well as in neuroblastoma NG-108-15 cells.

Studies on the mechanism of the organometal effect with EGTA and calcium channel blockers revealed that an influx of calcium from the extracellular space is responsible for the organometal-induced calcium elevation in HL-60 cells. The effect of the investigated lead compounds and tributyltin is due to calcium channel opening in the plasma membrane. The same is true for the NG108-15 cells. Activation of distinct receptor-mediated signal transduction is not the reason for channel opening. The regulation of cytosolic free calcium concentration was affected by inhibition of plasmamembrane  $Ca^{2+}$ -ATPasen as well as by disturbance of other ion gradients. A consequence of the organometal effect on the cytosolic calcium concentration is the activation of a cPLA<sub>2</sub> and perhaps the induction of apoptosis.

These results contribute towards the understanding of biochemical mechanisms causing the injury of cells by organometals.

---



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1. Einleitung .....	1
1.1. Blei- und Zinnverbindungen in der Umwelt.....	1
1.2. Die Belastung des Menschen durch Organometalle.....	2
1.3. Die Toxizität von Organometallen.....	3
1.4. Molekulare Wirkungsmechanismen der Organometalle .....	4
1.5. Die Struktur der Organometalle bestimmt ihre Toxizität .....	6
1.6. Die Regulation und Funktion des zellulären Calciums .....	7
1.7. Die Bedeutung von Calcium bei der Regulation zellulärer Prozesse .....	15
1.8. Ziel der Arbeit .....	17
2. Material und Methoden .....	19
2.1. Chemikalien .....	19
2.2. Zellkultur .....	20
2.2.1. Die HL-60 Zelllinie.....	21
2.2.2. Die NG108-15 Zelllinie.....	23
2.3. Calciummessung.....	25
2.4. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes mit dem pH-Indikator BCECF-AM.....	31
2.5. Verteilung der <sup>14</sup> C-Arachidonsäure innerhalb der Lipidklassen von HL-60 Zellen .....	32
2.6. Statistik .....	35
3. Ergebnisse .....	37
3.1. Untersuchungen der zellulären Signaltransduktion am Beispiel des Rezeptoragonisten fMLP .....	37
3.2. Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels in HL-60 Zellen durch Organometalle .....	39
3.3. Mechanistische Studien zur Wirkung der Organometalle auf die [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> .....	43
3.3.1. Der organometall-induzierte Calciuminflux ins Zytosol: Untersuchungen zur Quelle des Calciums .....	44
3.3.2. Untersuchung der Komponenten der Calcium-Signalwege.....	48
3.3.2.1. Der Effekt von Pertussistoxin auf den organometall-induzierten Calciuminflux.....	50
3.3.2.2. Der Effekt von 12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat (TPA) auf den organometall-induzierten Calciuminflux.....	51
3.3.3. Effekte der Organometalle auf die zellulären Ionengradienten .....	52
3.3.3.1. Untersuchungen zu Wirkungen auf Calciumkanäle der Plasmamembran .....	53
3.3.3.2. Der Effekt der Organometalle auf die Ca <sup>2+</sup> -ATPasen.....	58

---

3.3.3.3. Untersuchungen zum Effekt der Organometalle auf den Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher der Plasmamembran .....	61
3.3.3.4. Untersuchungen im chloridfreien Medium .....	63
3.3.3.5. Der Effekt der Organometalle auf den intrazellulären pH-Wert.....	64
3.4. Beteiligung des Calciuminfluxes an der organometall-induzierten Arachidonsäurefreisetzung.....	68
3.5. Untersuchungen zur Sekretion zellulärer Faktoren mit stimulierender Funktion .....	70
3.6. Untersuchungen mit niedrigen Konzentrationen der Organometalle .....	71
3.7. Organometalle und der Calciumhaushalt von neuronalen Zellen in Kultur .....	73
3.7.1. Effekte von Organometallen auf die zytosolische Calciumkonzentration von NG108-15 Zellen .....	75
3.7.2. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Organometalle in NG108-15 Zellen.....	78
3.7.2.1. Untersuchungen zur Beteiligung des extrazellulären Calciums am Organometalleffekt .....	78
3.7.2.2. Effekte der Organometalle auf die Calciumkanäle neuronaler Zellen .....	83
4. Diskussion .....	85
5. Zusammenfassung .....	111
6. Literaturverzeichnis .....	112

---

---

**Abkürzungen**

AA	Arachidonsäure
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	zytosolische freie Calciumkonzentration
DAG	Diacylglycerin
DBT	Dibutylzinnchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
fMLP	N-Formyl-Methionylleucylphenylalanin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
LC <sub>50</sub>	Konzentration eines Toxins, von der die Vitalität der Zellen in einer bestimmten Zeit auf 50 % reduziert wird
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NL	Neutrallipide
NRK-Zellen	normal rat kidney cells
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> (EC 3.1.1.4)
cPLA <sub>2</sub>	zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
PS	Phosphatidylserin
PT	Pertussistoxin
QSAR	Quantitative-Structure-Activity-Relationships
SM	Sphingomyelin
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TG	Thapsigargin
TBT	Tri- <i>n</i> -butylzinnchlorid
TBTO	Bis-(tri- <i>n</i> -butylzinn)-oxid
TEL	Triethylbleichlorid
TET	Triethylzinnbromid
TML	Trimethylbleichlorid
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TPhL	Triphenylbleichlorid
TPT	Tri- <i>n</i> -propylzinnchlorid
ÜS	Überstand
ZNS	Zentralnervensystem

---

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Blei- und Zinnverbindungen in der Umwelt

Die toxische Wirkung von Metallen ist schon sehr lange bekannt und die Menschheit hat schon seit vielen Jahrhunderten Erfahrungen mit ihrer gesundheitsschädigenden Wirkung gesammelt. Ihre Derivate, die Organometalle, sind seit dem 19. Jahrhundert publik.

Die erste Organobleiverbindung (Hexaethyldiblei) wurde 1853 synthetisiert. Organobleiverbindungen gewannen mit der Entwicklung von Verbrennungsmotoren an Bedeutung, da sie dem Benzin als Antiklopfmittel zugesetzt wurden. Dadurch stieg die Produktion von Tetraethylblei und später von Tetramethylblei so drastisch an, daß sie neben wenigen anderen zu den am meisten produzierten organischen Verbindungen gehörten (Grandjean, 1983). Im Jahr 1976 wurden in den USA dem Benzin 217.500 t Blei zugesetzt und erst mit der Einführung von bleifreiem Benzin sank der Bleiverbrauch langsam ab, 1983 betrug er noch 85.000 t (Blunden & Chapman, 1986). In Westeuropa lag der Bleiverbrauch in diesem Zeitraum ungefähr konstant bei 90.000 t pro Jahr (Blunden & Chapman, 1986) und erst Ende der 80er Jahre hat in Westeuropa die Einführung von bleifreiem Benzin zur Verringerung der Organobleiemission geführt (Umweltbundesamt, 1995). Weltweit wird aber bis heute verbleites Benzin verwendet, so werden z.B. in Indien jedem Liter Kraftstoff 560 mg Tetraethylblei zugesetzt (Shivakumar, 1993). Im Stadtverkehr kommen ca. 1-2 % der Organobleiadditive unverbraucht mit den Abgasen in die Umwelt.

Auch Organozinnverbindungen sind seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. Ihre Nachfrage nahm mit der Entdeckung ihrer starken bioziden Wirkung rapide zu. Während 1950 gerade 50 t produziert wurden, waren es im Jahr 1987 weltweit 35.000 t, davon 8.000 t Triorganozinnspezies (Blunden & Chapman, 1986) mit einer Vielfalt von Anwendungsmöglichkeiten. In der Holzverarbeitenden Industrie und in der Landwirtschaft werden sie als Fungizide und Insektizide eingesetzt. Der Zusatz von Tributylzinn (TBT) in Schiffsanstrichfarben hat zu dessen Verbreitung in aquatischen Ökosystemen geführt, da der Anteil von TBT in den Farben bis zu 20 Gewichtsprozent beträgt und der Farbanstrich, der nicht sehr beständig ist, alle 2 Jahre erneuert werden muß. Mitte der 80er Jahre wurde TBT als Zusatz zu Schiffsanstrichfarben

wegen seiner hohen Toxizität in England, USA und Frankreich verboten. In Deutschland dürfen nur noch Schiffe, die länger als 25 m sind, mit TBT-haltigen Farben gestrichen werden. Es wurde festgestellt, daß die letale Dosis für Larven von Invertebraten 1 µg/l beträgt, und daß selbst mit noch niedrigeren Konzentrationen die Wachstums- und Reproduktionsrate von Muscheln vermindert ist (zitiert nach Martin-Landa *et al.*, 1989). Dialkylierte Zinnverbindungen werden Kunststoffen, insbesondere dem PVC, als Stabilisatoren beigemischt.

## 1.2. Die Belastung des Menschen durch Organometalle

Der Mensch kann sich der Aufnahme von toxischen Metallen nicht mehr entziehen. Die Inkorporation erfolgt vor allem durch die Luft und mit der Nahrung. In die Luft gelangen insbesondere die Organobleiverbindungen aus Kraftfahrzeugabgasen, aber auch aus anderen Quellen, wie z.B. aus Mülldeponien, so wurde in Deponiegasen 120-4400 ng/m<sup>3</sup> Organozinn nachgewiesen, das durch Biomethylierung der abgelagerten Schwermetalle entstanden ist (Hirner *et al.*, 1994).

In verschiedenen Nahrungs- und Genußmitteln konnten bereits folgende Werte festgestellt werden:

**Tabelle 1:** Die Belastung von Nahrungs- und Genußmitteln mit Organometallen.

Organometall-spezies	Nahrungs- bzw. Genußmittel	Konzentration	Referenz
TBT	Lachs	0,188 ppb	Sullivan <i>et al.</i> , 1988
TBT	Lachs	0,85 µg/g FG <sup>1</sup>	Martin-Landa <i>et al.</i> , 1989
TBT	Fisch	2,04 ppm	Sasaki <i>et al.</i> , 1988
TBT	Austern	5,9 µg/g FG	Stephenson & Smith, 1988
TBT	Wein	0,8 ng/ml	Forsyth <i>et al.</i> , 1992
TEL	Wein	2,7 ng/l	Lobinski <i>et al.</i> , 1993
TML	Wein	1,8 ng/l	Lobinski <i>et al.</i> , 1993
TEL	Karpfen	1,2 µg/g FG	Chau <i>et al.</i> , 1984

<sup>1</sup> FG: Frischgewicht

Die Belastung der Meerestiere mit Organometallen liegt höher, als in der Umwelt, denn innerhalb der aquatischen Nahrungskette wurden in jüngster Zeit Bioakkumulationsfaktoren von 100.000

für Invertebraten und 10.000 für Vertebraten nachgewiesen (Von Burg & Greenwood, 1991). Im allgemeinen sind die Bioakkumulationsfaktoren mit 2-88 für Triethylblei und 120-3189 für Tetraethylblei bei weitem nicht so hoch (Chau *et al.*, 1988).

### 1.3. Die Toxizität von Organometallen

Die Organobleiverbindungen sind lipophil, so daß sie durch die Haut und die Epithelien der Lunge aufgenommen werden und direkt ins Blut gelangen. Aus den tetraalkylierten Verbindungen entstehen durch Dealkylierung in der Leber die relativ stabilen di- und trialkylierten Derivate. Die Anreicherung erfolgt nicht nur in der Leber, sondern auch in den Nieren und im Zentralnervensystem. In schweren Fällen von Vergiftungen mit Tetraethylblei wurden Konzentrationen von 50 µg/kg Frischgewicht im menschlichen Gehirn gefunden (Grandjean, 1983).

Die Belastung der Atemluft ist an Arbeitsplätzen mit hohen Organobleikonzentrationen von Bedeutung. In einer Studie wurde die Belastung von Tankstellenpersonal, Verkehrspolizisten und Kontrollpersonen verglichen. Durchschnittlich war das Tankstellenpersonal 84,8 µg, die Verkehrspolizisten 5,2 µg und die Kontrollpersonen 1,1 µg Tetraethylblei pro m<sup>3</sup> Atemluft exponiert. Diese unterschiedliche Belastung spiegelt sich in der Ausscheidung von Diethylblei mit dem Urin wieder. Beim Tankstellenpersonal wurde durchschnittlich 43 µg/l, bei Polizisten 8,38 µg/l und bei den Kontrollpersonen 3,82 µg/l Diethylblei im Urin nachgewiesen. In der Kontrollgruppe und bei den Verkehrspolizisten gab es keine klinischen Befunde, während beim Tankstellenpersonal eine signifikante Zunahme von Tremor und Bradykardie beobachtet wurde (Zhang, 1994).

Nach Exposition mit Organoblei in akut toxischen Konzentrationen sind die klinischen Manifestationen z.B. Kopfschmerz, Erbrechen, Beeinträchtigung des Gedächtnisses, Konzentrationsschwierigkeiten, Tremor, Schwäche und Schlaflosigkeit. Die Auswirkungen der chronischen Exposition sind nicht so leicht zu diagnostizieren. Bisher liegen nur einige Untersuchungen vor, die von Störungen des ZNS (Grandjean, 1983) und von pathologischen Veränderungen des Hippocampus und des Cerebellums berichten (Walsh *et al.*, 1986).

---

Organozinnverbindungen sind nach oraler Verabreichung bei Versuchstieren immuno- und hepatotoxisch. Die Atrophie des Thymus und die Suppression von thymusabhängigen Immunreaktionen wurde bei Ratten beschrieben. Die Schädigung der Leber und der Gallenkanäle, sowie Störungen des Hormonsystems wurden ebenfalls nachgewiesen (Henschler, 1991). Im Tierversuch manifestiert sich die Hepatotoxizität durch die Atrophie der Hepatozyten und führt in schweren Fällen zur Degeneration des gesamten Organs (Krajnc, 1984). Demgegenüber konnten bei Versuchstieren, denen mit der Diät Trimethylzinn und Triethylzinn verabreicht wurde neurotoxische Wirkungen festgestellt werden. Die Behandlung mit Triethylzinn hatte zur Folge, daß die Axone und die Myelinscheiden aufquollen. Die Verabreichung von Trimethylzinn war durch die Nekrose von Nervenzellen, vor allem im Hippocampus, charakterisiert (Boyer, 1989). Als Folge einer Intoxikation traten Lähmungen, Tremor, Kopfschmerzen, Erbrechen und Störungen des Gleichgewichtssinns auf (Dauderer, 1990).

#### **1.4. Molekulare Wirkungsmechanismen der Organometalle**

Gerade subklinische Effekte bleiben oft unbemerkt, da die Symptome nur langsam, fast unmerklich auftreten und nicht unmittelbar mit den Schadstoffen in Zusammenhang gebracht werden können. Deshalb ist es auf diesem Gebiet besonders wichtig, biologische Testsysteme zu finden, mit denen die Wirkungen von geringen Toxinkonzentrationen erkannt werden können. Um dieses Problem angehen zu können, müssen zunächst einzelne Aspekte herausgegriffen und z.B. isolierte Organe, oder, nach einem weiteren Schritt der Vereinfachung, einzelne Zellen untersucht werden. Nach der Analyse der Wirkungsmechanismen auf zellulärer bzw. organischer Ebene kann dann versucht werden, die Einzelaspekte, die auf allen Ebenen untersucht wurden, vergleichbar mit einem Puzzle wieder zu einem Ganzen zusammenzufügen und dadurch eine realistische Einschätzung der Risiken für Menschen und andere Lebewesen zu ermöglichen.

*In vitro* Zellkulturen sind deshalb zu attraktiven und weitverbreiteten Untersuchungsobjekten in der Zellbiologie geworden, und viele Zellkulturen sind gegenwärtig sehr gut beschrieben. Durch diese Charakterisierung hat sich herauskristallisiert, daß Zellen in Kultur ihre Eigenschaften verändern. So verlieren z.B. primäre Hepatozyten in Kultur einige ihrer metabolischen

---

Fähigkeiten. Wenn Wirkungsmechanismen von Toxinen untersucht werden sollen, müssen deshalb Zellkulturen ausgewählt werden, die im zu untersuchenden Prozeß genauso kompetent sind, wie ihre Stammzellen im Organismus.

Zur Aufklärung von molekularen Wirkungsmechanismen der Organobleiverbindungen liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. Die ersten Experimente mit isolierten Mitochondrien zeigten, daß durch Triethylblei der Energiehaushalt gestört wird. Es interkaliert in die Mitochondrienmembran und bewirkt den Austausch von Chloridionen gegen Hydroxidionen durch die Membran. Dadurch wird der Protonengradient verringert, wobei die treibende Kraft der Chloridgradient an der Membran ist (Aldridge, 1976). Dieser Untersuchung folgten, nachdem die Bedeutung von Calcium bei der Signaltransduktion klar wurde, Berichte über die Wirkung von Triethylblei auf den Calciumhaushalt. Es wurde nachgewiesen, daß Triethylblei den zytosolischen Calciumspiegel von Hepatozyten erhöht, indem es die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Mitochondrien- und der Zytoplasmamembran hemmt (Albano *et al.*, 1994). Untersuchungen zur neurotoxischen Wirkung von Triethylblei wurden von Komulainen und Bondy (1987) an Synaptosomen durchgeführt, die von Rattenneuronen präpariert worden waren. Sie stellten fest, daß Triethylblei hauptsächlich an der Plasmamembran wirkt, wo es zu einer Depolarisation des Membranpotentials führt, wodurch ein Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle auslöst wird. Die Mitochondrien bleiben von Triethylblei unbeeinflusst. Eine weitere Arbeit dieser Gruppe (Kauppinen *et al.*, 1988) mit Synaptosomen aus Meerschweinchen beschrieb konträre Ergebnisse. In diesem System veränderte sich das Membranpotential nur geringfügig. Der Calciumeinstrom war also nicht mit dem gleichen Mechanismus erklärbar. Zusätzlich wurde eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und eine verstärkte Respiration festgestellt. Die Organometalle verursachen demnach unterschiedliche Wirkungen, wenn verschiedene Zellen untersucht werden.

Audesirk und Kollegen (1989) machten die Beobachtung, daß an Neuronen von Hühnerembryonen das Auswachsen von Neuriten durch Triethylblei vermindert wurde und erklärten dies mit Veränderungen des Zytoskeletts. Es ist bekannt, daß die Organisation des Zytoskeletts von der Calciumkonzentration abhängig ist. In unserem Labor wurde gezeigt, daß Organobleiverbindungen das Zytoskelett von HL-60 Zellen (Käfer *et al.*, 1992) und Epithelzellen

der Rattenniere verändern (Krug *et al.*, 1993). Als weiterer calciumgesteuerter Prozeß, wurde die Arachidonsäurefreisetzung nach Aktivierung einer zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) durch die Organobleiverbindungen beschrieben (Krug & Berndt, 1987; Krug & Culig, 1991; Käfer *et al.*, 1992).

Im Vergleich zu den Organobleiverbindungen wurde den Wirkungen der Zinnverbindungen Trimethylzinn, Triethylzinn, Tripropylzinn und Tributylzinn bisher mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Wie Triethylblei transportieren die genannten Zinnverbindungen Cl<sup>-</sup> im Austausch gegen OH<sup>-</sup> durch die Membran von isolierten Mitochondrien (Aldridge, 1976) aber auch durch andere Membranen (Selwyn, 1976). Zusätzlich wird die Atmungskette und die F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase beeinflusst (Snoeij *et al.*, 1986; Chow *et al.*, 1992).

Die Beeinträchtigung des Calciumhaushalts war bereits Gegenstand von Untersuchungen mit Organozinnverbindungen. Die Aktivierung von Calciumkanälen (Chow *et al.*, 1992) und die Hemmung von Ca<sup>2+</sup>-ATPasen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Kodavanti *et al.*, 1991) und der Zytoplasmamembran (Chow *et al.*, 1992) wurde beschrieben. Tributylzinn induziert auch die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Chow *et al.*, 1992; Oyama *et al.*, 1994). Als Folge des gestörten Calciumhaushalts werden, wie nach Triethylblei Exposition beschrieben, calciumregulierte Prozesse beeinflusst. So wurde bereits von der Modifikation des Zytoskeletts (Marinovich *et al.*, 1990) und der Aktivierung einer cPLA<sub>2</sub> berichtet (Zaucke, 1993). Auch die Induktion der Apoptose durch Tributylzinn wird im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol diskutiert, da es zur Aktivierung von Endonukleasen kommt, welche die DNA fragmentieren (Aw *et al.*, 1990; Raffray & Cohen, 1991). Die Signaltransduktion durch cAMP wird durch Triethylzinn (Kodavanti *et al.*, 1991), Tripropylzinn und Tributylzinn beeinträchtigt (Snoeij *et al.*, 1986).

## **1.5. Die Struktur der Organometalle bestimmt ihre Toxizität**

Die Toxizität der organischen Zinn- und Bleiverbindungen ist sehr unterschiedlich. Es hat sich herausgestellt, daß neben dem zentralen Metallatom hauptsächlich der Alkylierungsgrad und die Länge der Kohlenwasserstoffkette die toxische Kapazität bestimmen. Die Toxizität steigt mit

zunehmender Alkylkettenzahl und zunehmender Länge der Alkylkette an, erreicht bei einer Kettenlänge von 4-5 Kohlenstoffatomen ein Maximum und nimmt dann wieder ab, da mit zunehmender Kettenlänge die polare Komponente maskiert und zusätzlich die Bildung von Micellen gefördert wird (Schüürmann & Röderer, 1988; Ade *et al.*, 1996). Die Grundlage dafür sind wohl die ambivalenten chemischen Eigenschaften der Organometalle. Die hydrophoben Eigenschaften der Alkylketten begünstigen die Wechselwirkungen mit zellulären Membranen und Lipiden (Ali *et al.*, 1987; Gray *et al.*, 1987), während das polare Metallatom möglicherweise die spezifischen Reaktionen mit Membrankomponenten, wie Ionenkanälen und Enzymen, vermittelt. So haben Bindungsstudien gezeigt, daß Zinnatome mit Thiolgruppen und heterozyklischen Stickstoffatomen Komplexe bilden, wodurch Enzyme wie die Häm-Oxygenase aktiviert (Rosenberg *et al.*, 1984) oder die Glutathion-Transferase gehemmt werden können (Mosialou & Morgenstern, 1989). Es wurde aber auch gezeigt, daß die dreidimensionale Struktur der Verbindungen wichtig für die Bindung an Proteine ist (Siebenlist & Taketa, 1986). Die Kombination dieser gegensätzlichen Charakteristika ist verantwortlich für die toxische Potenz dieser Substanzen.

## 1.6. Die Regulation und Funktion des zellulären Calciums

Es ist eine interessante Frage, warum sich im Lauf der Evolution gerade Calcium als *second messenger* entwickelt hat. Calcium hat als Ion einen relativ hohen Diffusionskoeffizienten und eignet sich daher gut, um Signale an Membranen zu übertragen, wenn ein Konzentrations- bzw. ein elektrischer Gradient vorhanden ist. Diese Gradienten werden durch Transportsysteme aufrechterhalten und sind wohl ursprünglich dadurch entstanden, daß im Zytosol viele Phosphatester vorhanden sind, die mit Calcium schwerlösliche Salze bilden. Der Gradient an der Plasmamembran für Calcium ist sehr hoch, da im extrazellulären Raum 1-2 mM und im Zytosol nur 50 - 100 nM freies Calcium vorhanden ist, so daß eine große elektrochemische Kraft entsteht. Schon bei geringen Permeabilitätsänderungen der Plasmamembran, induziert durch einen physiologischen Stimulus, kommt es daher zu deutlichen Veränderungen des zytosolischen Calciumspiegels, der zu Signalzwecken genutzt werden kann. Es ist wichtig zu beachten, daß es

sich bei dem besprochenen Konzentrationsunterschied zwischen zytosolischem und extrazellulärem Calcium um ionisches Calcium handelt. Die Calciumkonzentration im Zellinneren kann ebenfalls im millimolaren Bereich liegen, Erythrozyten enthalten 20  $\mu\text{M}$ , Nervenzellen 1,5 mM, Leberzellen 1,6 mM, Lymphocyten 2 mM und Herzzellen 4 mM Calcium, davon ist nur ein Bruchteil freies Calcium, da der Großteil an Proteine gebunden ist.

Im Vergleich zu anderen Ionen, die im Zellinneren mit Calcium um Bindungsstellen konkurrieren, besitzt Calcium noch weitere Eigenschaften, die es als *second messenger* besonders geeignet machen. Calcium ist fähig, mehrere Liganden zu binden, z.B. 6-8 Sauerstoffatome, wobei es keine Rolle spielt, ob das Sauerstoffatom geladen oder nur polarisiert ist. Das Magnesiumion, das der intrazelluläre Konkurrent von Calcium ist, zeigt hingegen keine besondere Affinität zu ungeladenem Sauerstoff. Calcium unterscheidet sich von Magnesium auch dadurch, daß es asymmetrische Koordinationsräume mit großem Radius bildet, während Magnesium einen oktaedrischen Koordinationsraum mit kleinem Radius besitzt. Calcium ist somit besser an unregelmäßige Hohlräume von Proteinen angepaßt und ist in der Lage, Proteinstrukturen zu vernetzen, wodurch Konformationsänderungen hervorgerufen werden können. Magnesium kann sich nicht so gut in die Proteinstrukturen einpassen und sättigt seine Koordinationsstellen mit Sauerstoff aus dem Wasser ab, wodurch seine Affinität zu den Proteinen entscheidend herabgesetzt wird. Dadurch ist Calcium als Bindungspartner bevorzugt, selbst wenn Magnesium im 1000fachen Überschuß vorliegt.

### **Die Regulation der zytosolischen Calciumkonzentration**

Temporäre Änderungen der zytosolischen Calciumkonzentration sind ein ubiquitäres intrazelluläres Signal. Während viele andere *second messenger* Moleküle metabolisiert werden können, trifft dies für Calcium nicht zu. Die Zelle muß daher den Calciumspiegel sehr genau kontrollieren und regulieren. Sie ist dafür mit calciumbindenden und -transportierenden Proteinen ausgestattet. Diese Proteine müssen besonders gestaltet sein, um Calcium selektiv binden bzw. leiten zu können. Von großer Bedeutung sind auch die Calciumkanäle, von denen sich je nach Zelltyp unterschiedliche Arten finden. In erregbaren Zellen sind spannungsabhängige Calciumkanäle vorhanden, und generell finden sich in allen Zellen rezeptor-, *second messenger*-

und G-protein-gesteuerte Calciumkanäle. Außerdem existieren Kanäle, die durch einen löslichen Faktor (CIF, Abb. 1) gesteuert werden, der im ER gebildet wird (Fascolato *et al.*, 1994). Ein spannungsabhängiger Kanal setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, die aus jeweils sechs membrandurchspannenden Domänen bestehen. Die fünfte und sechste membrandurchspannende Domäne einer Kanaluntereinheit sind durch die Porenschleifen verbunden, die den Selektivitätsfilter formieren. Die Selektivität wird durch bestimmte Aminosäuren der Schleifen bestimmt (Catterall, 1994; MacKinnon, 1995).

In der Plasmamembran wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen sowie  $\text{Ca}^{2+}/3 \text{Na}^{+}$ -Austauscher nachgewiesen und inzwischen werden auch  $\text{Ca}^{2+}/2 \text{H}^{+}$ -Austauscher diskutiert (Tsunoda *et al.*, 1991, Yang *et al.*, 1995).

Im endoplasmatischen Retikulum (ER) bzw. SR sind hauptsächlich Proteine wie die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und die  $\text{IP}_3$ - bzw. ryanodin-sensitiven Calciumkanäle an der Regulation des Calciumhaushalts beteiligt. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des ER unterscheiden sich pharmakologisch von denen der Plasmamembran, da sie z.B. durch Thapsigargin oder Cyclopiazonsäure hemmbar sind (Demaurex *et al.*, 1992; Scharff & Foder, 1993).

### **Calciumpufferung von Zytoplasma, Plasmamembran, ER und SR**

Ein Großteil des intrazellulär vorhandenen Calciums wird in den Organellen gespeichert. Die Speicherung ist von energieverbrauchenden Transportproteinen, den  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, abhängig. Zusätzlich kann Calcium an negativ geladene Phospholipide der Membranen binden. Aber auch Metabolite, wie zum Beispiel organische und anorganische Phosphate, binden Calcium. In menschlichen Neutrophilen und Blutplättchen ist die zytosolische Pufferkapazität für Calcium ca. 0,7 mmol/l mit durchschnittlichen  $K_D$ -Werten von 0,55 bzw. 0,14  $\mu\text{mol/l}$ . Die Pufferkapazität des Zytosols ist von der Protonen- und der Magnesiumkonzentration abhängig, da diese mit Calcium um die Bindungsstellen konkurrieren. Eine wichtige Rolle spielen calciumbindende Proteine im Zytosol und in den Organellen, die spezielle Bindungsstellen mit hoher Affinität zu Calcium besitzen. Diese Proteine werden nach strukturellen Merkmalen den Annexinen oder der EF-Hand Familie zugeordnet. Das wichtigste Protein der EF-Hand Familie ist Calmodulin, ein ubiquitärer Modulator von Proteinkinasen und anderen Enzymen. Ein weiteres Beispiel ist Troponin, das bei

niedrigen Calciumkonzentrationen die Wechselwirkung von Aktin und Myosin verhindert. Andere Proteine dieser Familie wirken, soweit bisher bekannt, als Calciumpuffer, wie z.B. Parvalbumin oder Calbindin. Die Proteine, die zur Gruppe der Annexine gehören, binden in Gegenwart von Calcium an saure Phospholipide der Plasmamembran. Beispiele sind das Gelsolin, das mit dem Zytoskelett assoziiert ist, sowie Calpactin, Lipocortin und Endonexin, die bei der Sekretion von Vesikeln involviert sind.

Im ER, das als Hauptspeicher des  $IP_3$  sensitiven Calcium gilt, binden Proteine wie das Calsequestrin und das Calreticulin 0,2 - 0,4 mmol/l Calcium. Diese Proteine besitzen eine geringe Affinität zu Calcium ( $K_d$ : 1-4 mM), so daß Calcium jederzeit für Signalzwecke mobilisiert werden kann. Mitochondrien akkumulieren bis zu 0,5 mmol/l Calcium in ihrer Matrix (Scharff & Foder, 1993).

### **Die Bedeutung von Calcium in anderen zellulären Organellen**

Die innere Mitochondrienmembran enthält drei Proteine, die für den Calciumhaushalt von Bedeutung sind. Neben einem elektrogenen Calciumtransporter, der Calcium sehr schnell, durch das Membranpotential getrieben, vom Zytosol in die mitochondriale Matrix pumpt, existieren  $Ca^{2+}/3 Na^{+-}$ , bzw.  $Ca^{2+}/2 H^{+-}$ -Antiporter, die Calcium ins Zytosol transportieren. Dieser Calciumefflux ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials an der inneren Mitochondrienmembran. Da das Membranpotential sehr negativ ist (-180 mV), besteht ein großer elektrochemischer Gradient der den Einstrom von Kationen stark begünstigt (Pozzan *et al.*, 1994).

Im Gegensatz zum im ER gespeicherten Calcium wird dem mitochondrialen Calcium keine wichtige Rolle bei der Steuerung von zytosolischen Vorgängen zugeschrieben, es soll vielmehr für die Funktion der Mitochondrien von Bedeutung sein.

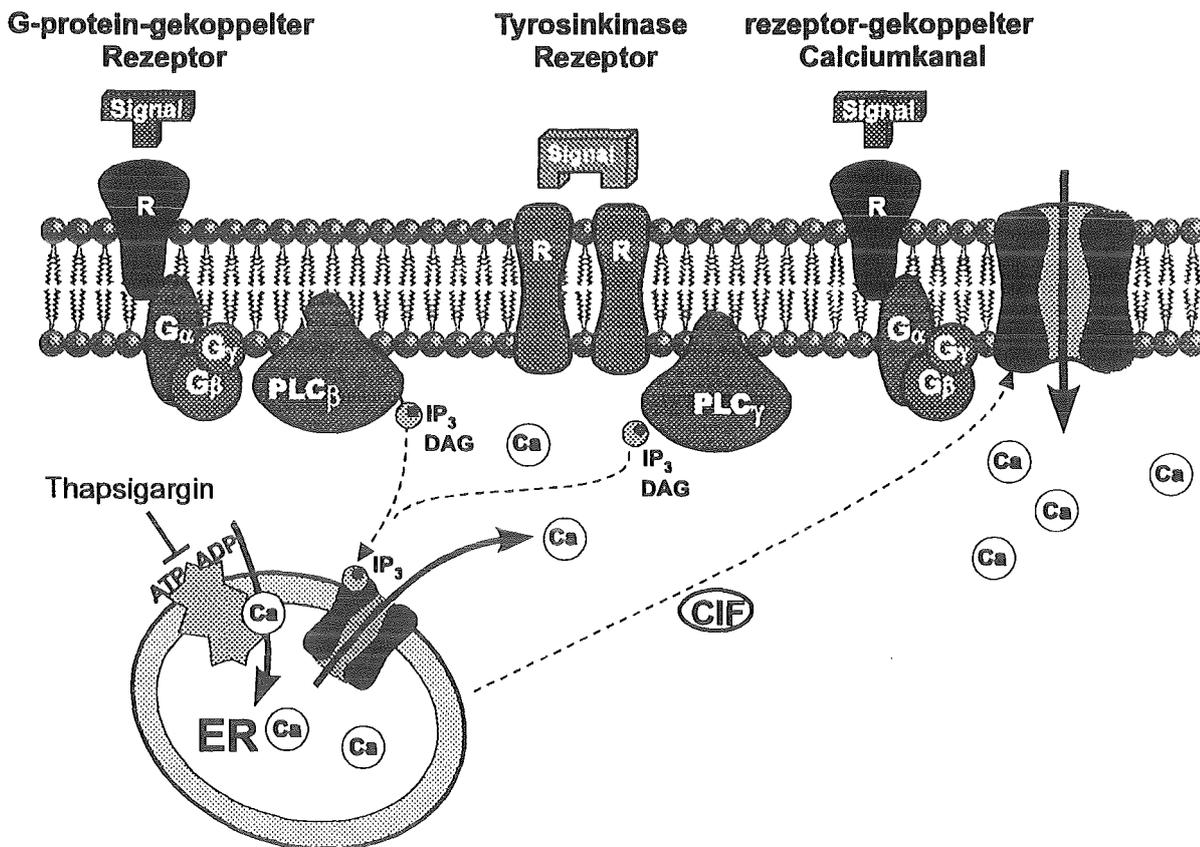
Der hohe Calciumgehalt der Granula und Vesikel, wie z.B. der chromaffinen Granula des Nebennierenmarks und der Zymogengranula des exokrinen Pankreas, ist schon lange bekannt, aber dessen Funktion ist weitgehend unbekannt.

Die Funktion von Calcium im Kern ist bisher noch wenig untersucht und wird immer noch diskutiert. Es gibt inzwischen wichtige Hinweise auf die Beteiligung bei der DNA-Replikation und

der Genexpression. Insbesondere ist bisher nicht klar, ob sich die Calciumkonzentration im Kern als Folge der Diffusion von Calcium durch die Kernporen dem Zytosol anpaßt, oder ob der Kern die Calciumkonzentration unabhängig reguliert. Von beiden Möglichkeiten wurde in der Literatur berichtet (Scharff & Foder, 1993).

**Calcium als *second messenger***

Calcium leitet Signale, die an der Außenseite der Zellmembran ausgelöst werden im Zytosol weiter. Bei den Signalen handelt es sich in nicht erregbaren Zellen um Hormone, Wachstumsfaktoren oder Mediatoren, die nicht durch die Zytoplasmamembran diffundieren können und daher an Rezeptoren binden. Gegenwärtig werden mindestens zwei Rezeptorklassen unterschieden (Abb. 1). Die G-protein-gekoppelten Rezeptoren (GPR) mit 7 transmembranen Domänen und die Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (TKR). Wachstumsfaktoren, wie PDGF (platelet derived growth factor) oder EGF (epidermal growth factor), verbinden durch ihre



**Abb. 1:** Schema der Signaltransduktionswege, welche die zytosolische freie Calciumkonzentration steuern. Details finden sich im Text.

Anlagerung zwei Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität und als Folge gegenseitiger Phosphorylierungen entsteht eine Bindungsstelle für die Phospholipase C- $\gamma$ , (PLC- $\gamma$ ) die dadurch an die Membran verlagert und nach Phosphorylierung aktiviert wird. Hormone, wie Adrenalin, Bradykinin oder Glucagon, verändern, nachdem sie an den Rezeptor gebunden haben, dessen Konformation, die auf das assoziierte trimere G-Protein übertragen wird und zu dessen Dissoziation in  $G_{\alpha}$  und  $G_{\beta\gamma}$  führt. Die  $G_{\alpha}$  Untereinheit tauscht danach GDP gegen GTP und aktiviert durch Interaktion an spezifischen Bereichen die PLC- $\beta$ . Die GPR stimulieren Enzyme vom Typ PLC- $\beta$ , während die TKR Enzyme vom Typ PLC- $\gamma$  aktivieren. Beide PLC-Typen katalysieren die Freisetzung von Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) aus Phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphat. Die beiden freigesetzten Substanzen sind *second messenger* und  $IP_3$  löst die Freisetzung von Calcium aus dem ER aus, nachdem das Molekül an seinen Rezeptor am ER gebunden hat. Calcium wird aber nicht nur aus intrazellulären Speichern freigesetzt, sondern strömt zusätzlich durch spannungsunabhängige, *second messenger*-gesteuerte, bzw. durch Rezeptor-gekoppelte Kanäle, von außen ins Zytosol. Eine der aufregendsten Entdeckungen in der jüngeren Zeit, die im Zusammenhang mit dem Calciumhaushalt gemacht wurden, war die Aktivierung eines Calciumstroms von außen durch die Plasmamembran ins Zytosol nach der Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern, der als kapazitativer Calciumeinstrom bezeichnet wurde (Putney, 1986). Diesem Modell liegt die Beobachtung zugrunde, daß in einigen Zellen ein Calciumeinstrom durch die Plasmamembran stimuliert wurde, nachdem die artifizielle Entleerung des ER durch Thapsigargin, einem Inhibitor der  $Ca^{2+}$ -ATPasen des ER, der nicht die Bildung von  $IP_3$  induziert, herbeigeführt wurde (Abb. 1). Es wurde ein diffusionsfähiger Botenstoff (Calcium Influx Faktor, CIF) postuliert, der nach der Entleerung der Speicher gebildet wird und den beobachteten Calciumstrom durch die Membran auslöst. Als Alternative zum CIF wird die Interaktion von Membranproteinen des ER mit den Calciumkanälen der Plasmamembran diskutiert. Für beide Mechanismen gibt es bislang keine überzeugenden experimentellen Befunde (Clapham, 1995).

Erregbare Zellen besitzen, neben den für nichterregbare Zellen schon angesprochenen Systemen, spannungsabhängige Calciumkanäle, die es diesen Zellen ermöglichen, den zytosolischen Calciumspiegel dramatisch zu erhöhen. Die Depolarisierung des Membranpotentials initiiert

Konformationsänderungen von spannungssensitiven Regionen der Kanäle, wodurch der Calciumdurchtritt ermöglicht wird. Das Ausmaß der Depolarisation bestimmt die elektrochemische Kraft für den Calciumeinstrom, während die Öffnungszeit unabhängig davon ist. Der Calciumeinstrom aktiviert dann Ryanodin-Rezeptoren, die wiederum die Freisetzung von Calcium aus den intracellulären Speichern auslösen (Berridge, 1993).

### Calciumoszillationen

In vielen verschiedenen Zelltypen sind inzwischen Calciumoszillationen nachgewiesen worden. Diesen wird eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion zugeschrieben, obwohl die Mechanismen und ihre biologische Relevanz noch nicht geklärt sind. Es wird angenommen, daß durch die Oszillationen Proteinphosphorylierungen reguliert werden und daß sie eine Form von frequenzmodulierten Signalen darstellen. Sie sollen die Signalerkennung erhöhen, die Desensibilisierung der Zellen und die Toxizität von Calcium verhindern.

Nach physiologischen Merkmalen werden sie in zwei Klassen unterteilt: zytosolische Calciumoszillationen, die durch periodische Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern charakterisiert sind, und Plasmamembran-Oszillationen, die man im allgemeinen bei erregbaren Zellen findet. In diesen Zellen sind die Calciumoszillationen durch Öffnen und Schließen von spannungsabhängigen Calciumkanälen gesteuert, die von  $K^+$ -Strömen begleitet werden. Der  $Ca^{2+}$ -Einstrom aktiviert Kaliumkanäle in der Plasmamembran und der  $K^+$ -Ausstrom führt zu einer Hyperpolarisation der Membran, wodurch sich die Calciumkanäle schließen. Der versiegende  $Ca^{2+}$ -Strom beendet dann den  $K^+$ -Strom und mit der anschließenden Repolarisation ist die Voraussetzung für eine erneute Depolarisation geschaffen.

Wesentlich komplizierter sind die Mechanismen bei den zytosolischen Oszillationen, bei denen zwischen rezeptor-gesteuerten und *second messenger*-abhängigen Modellen unterschieden wird. Im zuerst genannten Modell ist die Oszillation von der periodischen Entleerung der  $IP_3$ -sensitiven Speicher entsprechend einem Ansteigen und Absinken der  $IP_3$  Konzentration abhängig. Diese  $IP_3$ -Oszillation kommt wiederum durch eine negative Rückkopplung zustande, bei der die Proteinkinase C (PKC) die PLC hemmt. Die Hemmung wird durch Phosphorylierung des Rezeptors oder des G-Proteins erreicht und die anschließende Dephosphorylierung soll, gefolgt

von einer erneuten  $IP_3$  Produktion, den Zyklus aufrecht erhalten. Das zweite Modell, das sich wiederum in mehrere Kategorien unterteilen läßt, postuliert die Rückkopplung zwischen  $IP_3$  und Calcium. Die von  $IP_3$  eingeleitete Calciumfreisetzung verstärkt zunächst die  $IP_3$ -Produktion, da die PLC aktiviert wird. Als unmittelbare Folge steigt die Calciumkonzentration im Zytosol weiter an. Nachdem das  $IP_3$  metabolisiert ist, wird Calcium wieder in die Speicher zurückgepumpt, wobei auch die Mitochondrien beteiligt sein sollen. Sind die Speicher wieder gefüllt, soll durch  $IP_3$  erneut Calcium freigesetzt werden, womit sich der Kreis schließt. Andere Experimente deuten darauf hin, daß bei erhöhter Calciumkonzentration die Affinität des  $IP_3$ -Rezeptors sinkt und dadurch die Wiederauffüllung der Speicher, sowie das Absinken der zytosolischen Calciumkonzentration zustande kommt. Letztendlich sind Oszillationen auch noch möglich, wenn Calcium selbst die Freisetzung von Calcium induziert. Da für die Calciumaufnahme in die Speicher Energie benötigt wird, können die Oszillationen auch von lokalen Veränderungen der ATP Konzentration abhängig sein.

Es muß hier betont werden, daß es sich um Modelle handelt, für deren Validität noch Beweise erbracht werden müssen. Details finden sich in den Reviews von Berridge (1993) und Tsunoda (1993).

### **Calciumwellen**

Das Phänomen einer Oszillation, die sich als ein Puls erhöhter  $Ca^{2+}$ -Konzentration von einem Pol der Zelle zum anderen über das Zytoplasma oder von der Plasmamembran ins Zellinnere ausbreitet, wird als Calciumwelle bezeichnet. Calciumwellen werden von einer spezifischen Region der Zellen initiiert. Die Wellen wurden zuerst während der Fertilisation von Seeigel- und *Xenopus*-Eiern nachgewiesen (Berridge, 1993).

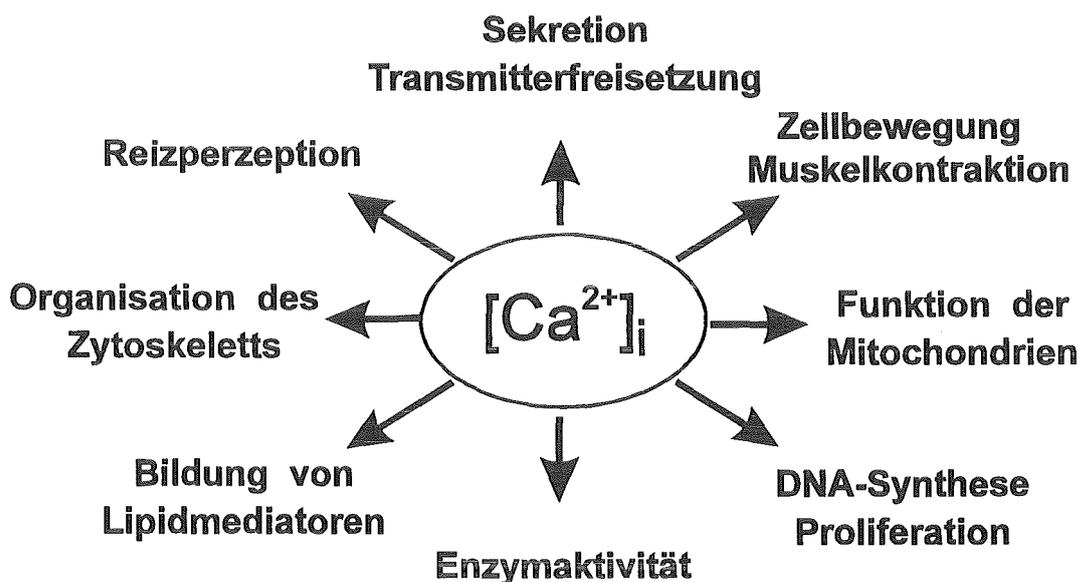
Auch für die Calciumwellen wurden Modelle entwickelt, die das Phänomen erklären helfen sollen. Sie gehen von Rückkopplungsmechanismen aus, wie sie für die Oszillationen beschrieben wurden. Die Ausbreitung der Welle soll auf die Diffusion von Calcium bzw.  $IP_3$  zurückzuführen sein. Die Calcium-induzierte Calciumfreisetzung vollzieht sich nachdem ein externer Stimulus den ersten Calciumeinstrom in das Zytosol ausgelöst hat. Dieser Einstrom wird durch  $IP_3$  oder spannungsabhängige Calciumkanäle vermittelt und dient zur Aufladung der intrazellulären

---

Speicher mit Calcium. Dadurch werden Rezeptoren an einer bestimmten Stelle der Speicher sensibilisiert, oder einer der Speicher wird durch die Erschöpfung seiner Calciumpufferkapazität zum Schrittmacher und startet die Freisetzung von Calcium. Calcium fungiert dann als *second messenger* und führt zur Freisetzung von weiterem Calcium aus benachbarten Speichern. Nachdem die Speicher entleert sind, beginnt die Regenerationsphase des Systems, in der die Speicher wieder gefüllt und überschüssiges Calcium durch Pumpen aus den Zellen entfernt wird.

## 1.7. Die Bedeutung von Calcium bei der Regulation zellulärer Prozesse

Das Calciumsignal ist hoch organisiert, vor allem in Bezug auf den räumlichen und zeitlichen Ablauf. Von seinem dynamischen Ablauf werden zahlreiche Prozesse reguliert bzw. kontrolliert (Abb. 2). Die Bildung von Lipidmediatoren, die von der Aktivität einer cPLA<sub>2</sub> ausgeht, soll im Anschluß genauer betrachtet werden.



**Abb. 2:** Von der zytosolischen freien Calciumkonzentration abhängige zelluläre Prozesse.

### Die Funktion und Regulation der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)

Die PLA<sub>2</sub> spielt eine zentrale Rolle beim Abbau und Metabolismus von Lipiden, in Immunreaktionen und im Zusammenhang mit der Signaltransduktion. Unter dem Namen PLA<sub>2</sub> wird eine ganze Klasse von Enzymen zusammengefaßt, die sich durch Struktur, Sequenz, Funktion, Lokalisation und Regulation unterscheiden. Die Enzyme werden in 4 Gruppen eingeteilt (Dennis, 1994). In die ersten drei Gruppen fallen die Enzyme, die sich z.B. im Schlangengift und

im Pankreas finden und die vor allem extrazellulär von Bedeutung sind. In der Gruppe 4 finden sich die zytosolischen Enzyme mit einem Molekulargewicht von 85 kDa und einer calciumbindenden Domäne. Die cPLA<sub>2</sub> katalysiert die Hydrolyse der an der *sn*-2 Position gebundenen Fettsäure von Phospholipiden. Dies ist der wichtigste Weg zur Freisetzung von Arachidonsäure aus der wiederum die Eicosanoide gebildet werden. An der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> sind zwei Mechanismen beteiligt. Zum einen die Verlagerung an die Membran, nach dem Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol auf 200-300 nM und zum anderen eine Phosphorylierung am Serin 505, die von einer Proteinkinase katalysiert wird. Für die Regulation der cPLA<sub>2</sub> werden mehrere Mechanismen diskutiert (Abb. 3). In einigen Zellen soll sie über G-protein-gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran erfolgen (Burch, 1989; Mukherjee *et al.*, 1994). In anderen Zellen wird die cPLA<sub>2</sub> als Element des mitogen-aktivierten Signaltransduktionsweges aktiviert. In der durch Wachstumsfaktoren über einen Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität ausgelösten Kaskade wird über eine Kette von Proteinphosphorylierungen die MAP-Kinase aktiviert, die dann die cPLA<sub>2</sub> phosphoryliert. Bei gleichzeitiger Erhöhung der Calciumkonzentration wird die cPLA<sub>2</sub> an die Membran verlagert (Lin *et al.*, 1993, Durstin *et al.*, 1994).

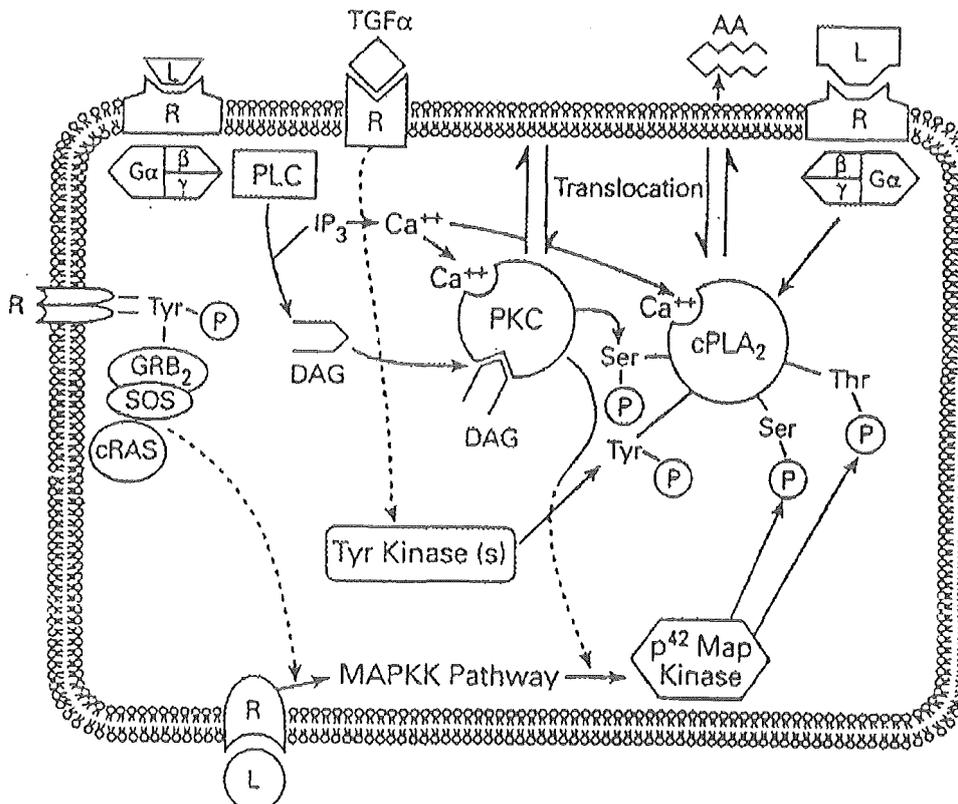


Abb. 3: Schematische Darstellung von möglichen Regulationsmechanismen der cPLA<sub>2</sub> aus Mukherjee *et al.*, 1994.

Weiterhin wird eine Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> über einen G-protein-gekoppelten Rezeptor diskutiert der die PLC aktiviert. Während das durch die Aktivität der PLC entstandene IP<sub>3</sub> den Calciumspiegel erhöht, aktiviert Diacylglycerol die Proteinkinase C, deren Substrat wiederum die cPLA<sub>2</sub> ist (Xing & Mattera, 1992).

## 1.8. Ziel der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, daß organische Zinn- und Bleiverbindungen eine Vielzahl von Reaktionen in Zellen hervorrufen können, die mehr oder weniger von einem induzierten Calciumeinstrom in das Zytosol der Zelle abhängig sind. Es war daher dringend notwendig, den direkten Effekt der Organometalle auf die Verteilung des Calciums und die Induktion von Ionenflüssen zu untersuchen. Diese Studien sollten an den gut charakterisierten HL-60 Zellen durchgeführt werden, da die Folgereaktionen wie die Arachidonsäurefreisetzung, die Veränderung des Zytoskeletts und die Apoptose bereits in erheblichem Umfang beschrieben worden sind. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität der cPLA<sub>2</sub> von unterschiedlichen Calciumpools sollte dabei von besonderem Interesse sein. Zusätzlich war die Frage zu klären, inwieweit andere Ionen und deren Gradienten an der Plasmamembran der Zellen an der Ausprägung eines Calciumsignals beteiligt sind.

Umweltschadstoffe, und hier vor allem die lipophilen Organometalle, zeichnen sich durch ihre Neurotoxizität in bestimmten Bereichen des ZNS aus. Aus diesem Grund wurden Zellen neuronaler Herkunft in die Untersuchungen miteinbezogen. Diese NG108-15 Zellen zeigen Reaktionen, die im wesentlichen bei Nervenzellen zu finden sind, wie Calciumwellen und -oszillationen und besitzen spannungsabhängige Calciumkanäle. Der direkte Einfluß der Organometalle auf die zytosolische freie Calciumkonzentration sollte mittels Videoanalyse dargestellt werden. Bei allen Untersuchungen stand die Aufklärung der molekularen Mechanismen des Calciumfluxes im Vordergrund, die eine Beteiligung von wichtigen Strukturen im Zusammenhang mit dem Calciumsignal, wie z.B. Calciumkanälen, aufzeigen sollten.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Chemikalien

[1- <sup>14</sup> C]Arachidonsäure	Amersham International (Braunschweig, BRD)
Calcium-Ionophor, A23187	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Acetylcholin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Amilorid-Hydrochlorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
(BCECF-AM) 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-6-Carboxyfluoresceinacetomethylester	Molecular Probes (Eugene, USA)
Bis-(tri- <i>n</i> -butylzinn)-oxid	Merck (Darmstadt, BRD)
Bradykinin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Dibutyryl-cAMP	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Digitonin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Dimethylsulfoxid	Serva (Heidelberg, BRD)
EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Serva (Heidelberg, BRD)
Fluo-3 Acetomethylester	Molecular Probes (Eugene, USA)
Fluo-3 freie Säure	Molecular Probes (Eugene, USA)
HEPES (N-[Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])	Serva (Heidelberg, BRD)
Manganchlorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
N-Formyl-Methionylleucylphenylalanin (fMLP)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Nickelchlorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Nigericin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid	Serva (Heidelberg, BRD)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Life Technologies (Eggenstein-Leopoldshafen, BRD)
Pertussis Toxin (PT)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies (Eggenstein-Leopoldshafen, BRD)
plättchenaktivierender Faktor (PAF)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Pluronsäure	Molecular Probes (Eugene, USA)
Probenecid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Rinderserumalbumin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Strophantin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Thapsigargin	Biomol (Hamburg, BRD)
Tri- <i>n</i> -butylzinnchlorid	Merck (Darmstadt, BRD)
Triethylbleichlorid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Triethylzinnbromid	Alfa (Karlsruhe, BRD)

Trimethylbleichlorid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Triphenylbleichlorid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Tri- <i>n</i> -propylzinnchlorid	Alfa (Karlsruhe, BRD)
Trypanblau	Serva (Heidelberg, BRD)

Alle Lösungsmittel (Chloroform, Diethylether, *n*-Hexan, Methanol), Säuren (Essigsäure, Ameisensäure) und Salze wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Merck (Darmstadt, BRD) bezogen.

Die Verbindungen Tributylzinn, Tripropylzinn und Triphenylblei wurden in Ethanol gelöst. Beim Ansetzen der Stammlösungen wurde darauf geachtet, daß die Vehikelkonzentration im Versuchsansatz nie 1 % überstieg, um einen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen. Trimethylblei, Triethylblei, Triethylzinn wurden in Wasser gelöst. Zusätzlich wurden Kontrollbehandlungen mit den Lösungsmitteln durchgeführt.

## 2.2. Zellkultur

Alle Zellkulturgefäße (Qualität TC, steril) stammten, sofern nicht anders erwähnt, von der Firma Greiner, Frickenhausen. Die Medien für die Zellkultur wurden stets steril filtriert (Bottle Top Filter, 22 µm Porenweite, Falcon, Heidelberg). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank (Typ B5061 EK-02, Heraeus, Stuttgart) bei einer relativen Feuchte von 95 %.

Die Zellkulturmedien und Zusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von Life Technologies (Eggenstein-Leopoldshafen) bezogen.

### Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde die gewünschte Zellzahl bei 200 × g abzentrifugiert und in FKS mit 9 % DMSO als Gefrierschutz aufgenommen. Sie wurden in Einfriergefäße (5 × 10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml) pipettiert, über Nacht in einem Styroporbehälter auf -80 °C gestellt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt. Beim Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Sobald die Zellsuspension mit 5 × 10<sup>6</sup> Zellen aufgetaut war,

wurde sie in Kulturmedium aufgenommen und bei  $200 \times g$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 20 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 250 ml Kulturflasche überführt.

### 2.2.1. Die HL-60 Zelllinie

Diese Zelllinie wurde von einer Patientin mit akuter promyeloischer Leukämie abgeleitet. Sie wurde erstmals von Collins und Kollegen (1977) beschrieben und ist inzwischen sehr gut charakterisiert. Es handelt sich um promyeloische Zellen, die durch unterschiedliche Induktoren sowohl in Richtung Makrophagen (Rovera *et al.*, 1979), als auch zu Granulozyten (Collins *et al.*, 1978; Newburger *et al.*, 1979) differenzieren. Während des Differenzierungsvorganges werden die Zellen kleiner, das Kern/Zytoplasma-Verhältnis sinkt, Nucleoli und zytoplasmatische Granula werden reduziert und der Zellkern segmentiert sich. Zusätzlich verändert sich ihre Ausstattung mit Rezeptoren und Enzymen, fünf Tage nach der Induktion wird das Wachstum eingestellt und die Proliferationsfähigkeit geht verloren (Collins *et al.*, 1978).

Die hier verwendeten Zellen stammen von der American Typ Culture Collection (ATCC Nr. CCL 240). Nach dem Auftauen wurden die Zellen bis zur Passage 15 verwendet.

#### Zusammensetzung des Kulturmediums:

450,0 ml	RPMI 1640
75,0 ml	FKS (fötales Kälberserum, für 30 Min bei 56 °C hitzeinaktiviert)
7,5 ml	L-Glutamin 200 mM
5,0 ml	Natriumpyruvat 100 mM
5,0 ml	MEM non essential amino acids
2,5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml)

Bei den HL-60 Zellen handelt es sich um eine Suspensionskultur, die sich innerhalb von etwa 24 h verdoppelt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Kulturfläche  $75 \text{ cm}^2$ , 250 ml) in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen mit 20 ml Kulturmedium angesetzt. Die Zellen wurden 2 mal pro Woche umgesetzt. Dazu wurde die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählgeräts (Coulter Counter, Coulter, Dunstable, UK) bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde dann durch Verdünnen mit frischem Kulturmedium eingestellt.

## Differenzierung der HL-60 Zellen zu neutrophilen Granulozyten

Die Differenzierung zu granulozyten-ähnlichen Endstufen erfolgte durch Zugabe von DMSO zum Kulturmedium. Die benötigten undifferenzierten Zellen wurden durch 5 minütige Zentrifugation bei  $200 \times g$  aus der Kultur gewonnen. Zur Differenzierung wurden  $1 \times 10^8$  Zellen in 100 ml Kulturmedium inklusive 1,3 % DMSO in Kulturflaschen (650 ml,  $175 \text{ cm}^2$  Kulturfläche) resuspendiert. Am fünften Tag der Differenzierung wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

## Bestimmung des Differenzierungsgrades von HL-60 Zellen (NBT-Test)

Zum Nachweis der Differenzierung wurde der NBT-Test durchgeführt (Wijermans *et al.* 1987). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden  $2 \times 10^6$  Zellen bei  $200 \times g$  zentrifugiert und einmal mit 3 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml PBS aufgenommen und mit 1 ml 0,2 %iger NBT-Lösung (NBT = Nitro-Blau-Tetrazolium, in PBS gelöst) versetzt. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  TPA-Lösung (0,05 mg TPA = 12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat, in 1 ml DMSO) wurden die Zellen für 25 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden dann wie oben abzentrifugiert und in 0,5 ml PBS aufgenommen. In einer Neubauer-Kammer wurden dann die Zellen ausgezählt, die blau-schwarze Formazan-Ablagerungen enthalten. Diese Ablagerungen entstehen durch Reduktion der Nitroverbindung aufgrund gebildeter Sauerstoffradikale. Differenzierte Zellen können nach Induktion durch TPA im Unterschied zu undifferenzierten Zellen Superoxidanionen verstärkt bilden. Undifferenzierte Zellen erscheinen daher hell. Der Differenzierungsgrad errechnet sich wie folgt:

$$\text{Differenzierung [\%]} = \frac{\text{Zahl der blau-schwarzen Zellen}}{\Sigma \text{ aller Zellen}} \times 100$$

Der NBT-Test wurde in dieser Arbeit stichprobenweise zur Kontrolle des Differenzierungsgrades angewandt.

## 2.2.2. Die NG108-15 Zelllinie

Die Nervenzelllinie NG108-15 ist eine sehr gut charakterisierte Hybridzelllinie aus Neuroblastomazellen der Maus und Gliomazellen der Ratte (Hamprecht, 1974; Hamprecht *et al.*, 1985), die viele Eigenschaften von Nervenzellen besitzt. Die hier verwendeten Zellen wurden von der European Collection of Animal Cell Culture (ECACC Nr. 88112302) bezogen.

### Zusammensetzung des Kulturmediums:

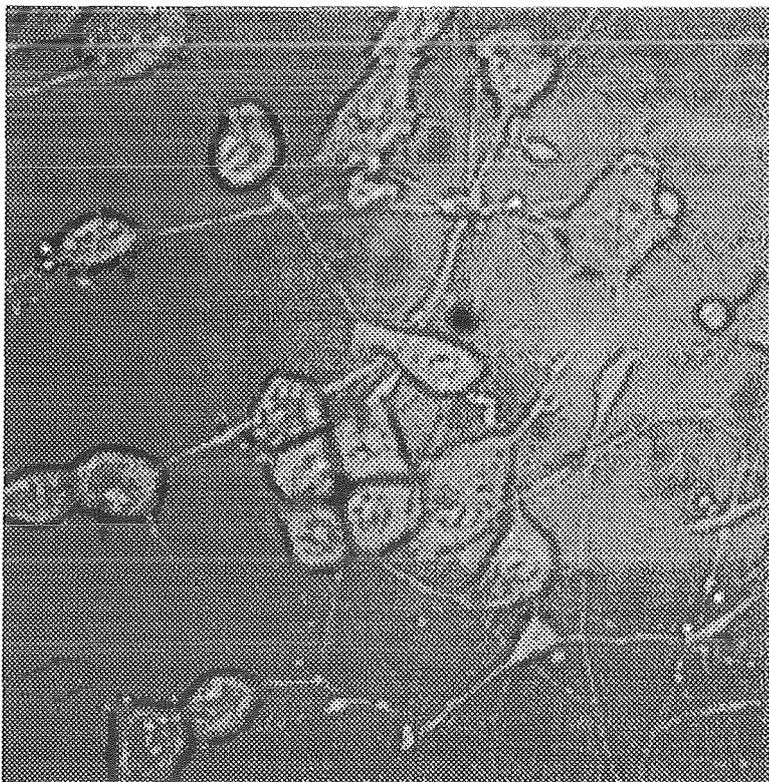
450,0 ml	DMEM
10,0 ml	HAT 50 x (1 mM Hypoxanthin; 0,27 mM Aminopterin; 20 mM Thymidin)
50,0 ml	FKS
2,5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml)

Durch die Zugabe von HAT werden Zellen selektioniert, die das Enzym Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyl-Transferase (HGPRT) besitzen. Dies sind im Fall der NG108-15 Zelllinie die Gliomazellen und da die NG108-15 Zelllinie eine Hybridomzelllinie ist, die fusionierten Zellen. Die Hybriden, die somit aus Hypoxanthin Inosinat bilden können, überleben, während die Blastomazellen, die HGPRT negativ sind, durch die Hemmung der Nukleotidsynthese mit Aminopterin absterben. Die Gliomazellen sterben in der Zellkultur ab, da sie *in vitro* nicht proliferieren können.

Die Zellen bilden in Zellkulturflaschen (250 ml, 75 cm<sup>2</sup> Kulturfläche) einen festsitzenden Monolayer. Die Subkultivierung erfolgte an jedem dritten Tag. Zur Hiezu wurden die Zellen für etwa 3 min mit Trypsin behandelt, nachdem das Kulturmedium abgezogen worden war. Dazu wurden 3 ml der Trypsinlösung (0,25 %) in die Flaschen pipettiert, vorsichtig über den Zellmonolayer verteilt und sofort wieder abgesaugt. Nach einer 3 minütigen Inkubation im Brutschrank hatten sich die Zellen abgelöst. Sie wurden in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und vereinzelt. Dann wurde die Zellzahl mit dem Zellszählgerät bestimmt. Zur Subkultivierung wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in 20 ml Medium in neue Kulturflaschen überführt.

## Differenzierung der NG108-15 Zellen

Die Differenzierung induziert sowohl Veränderungen auf morphologischer, als auch auf molekularer Ebene. Offensichtlich ist die vermehrte Ausbildung von axonähnlichen Strukturen. Auf molekularer Ebene bewirkt die Differenzierung die verstärkte Expression von spannungsabhängigen Calciumkanälen und Natriumkanälen (Noronha-Blob *et al.*, 1988). Aber auch Acetylcholin-Rezeptoren und Enzyme des Transmitterstoffwechsels, wie der Acetylcholinesterase, werden verstärkt exprimiert (Gahary & Cheng, 1989).



**Abb. 4:** Durchlichtaufnahme von NG108-15 Zellen, die 72 h mit Dibutyryl-cAMP (1 mM) differenziert worden waren. Die Vergrößerung ist ca. 300fach.

Die Differenzierung der Zellen wurde durch die Zugabe von Dibutyryl-cAMP (1 mM, 72 h) zum Kulturmedium bei einem auf 2 % reduzierten FKS-Gehalt erreicht. Dazu wurden die abgelösten Zellen bei  $200 \times g$  abzentrifugiert und in Differenzierungsmedium resuspendiert. In speziellen Kulturschalen (Chamber slides, Nunc, Wiesbaden) mit  $4 \text{ cm}^2$  Kulturfläche, die sich für die Untersuchung in einem inversen Mikroskop eignen, oder in  $35 \times 10 \text{ mm}$  Kulturschalen mit  $9,2 \text{ mm}^2$  Kulturfläche (Falcon Primaria, Becton Dickionson, Heidelberg) wurden  $3 \times 10^3$

Zellen/cm<sup>2</sup> in 2 ml Medium ausplattiert. Die Zellen wurden am vierten Tag für die Versuche verwendet.

### 2.3. Calciummessung

Die zytosolische Calciumkonzentration wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluo-3 bestimmt. Fluo-3 ist ein Fluoreszeinderivat, dessen Fluoreszenz nach Bindung von Calcium um das 40fache ansteigt, während andere zweiwertige Kationen die Fluoreszenz nur unwesentlich erhöhen. Der Farbstoff besitzt nur eine geringe Affinität zu Calcium ( $k_d = 450$  nM). Dadurch wird verhindert, daß er als Puffer für Calcium wirkt. Dadurch ist es möglich, schnelle zeitliche Änderungen der Calciumkonzentration zu detektieren. Weiterhin besitzt er ein Anregungsmaximum bei 490 nm, das nicht wie bei anderen Farbstoffen im UV-Bereich liegt. Dadurch ist erstens keine Schädigung der Zellen durch die anregende Strahlung zu erwarten und zweitens sinkt die Autofluoreszenz der untersuchten Probe.

Der Farbstoff ist als Acetomethylester erhältlich, so daß er aufgrund seiner Lipophilie ohne vorherige Permeabilisierung der Zellmembran in die Zelle eindringen kann. Im Zytoplasma wird der Ester hydrolysiert, wodurch er seine lipophilen Eigenschaften verliert, so daß er nicht mehr durch Membranen diffundieren kann und im Zytosol verbleibt.

#### **Beladung der HL-60 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3**

Differenzierte HL-60 Zellen wurden, nachdem die Zellzahl mit dem Coulter Counter bestimmt worden war, in Standard-Kulturmedium ohne FKS (FKS kann Esterasen enthalten, die den Farbstoffester hydrolysieren) mit 2 µM Fluo-3-AM aufgenommen. Dem Fluoreszenzfarbstoff war zuvor Pluronsäure (0,5 % v/v), ein anionisches Detergenz, zugesetzt worden. Das Medium wurde mit 10 mM HEPES und 4 mM NaHCO<sub>3</sub> gepuffert und auf pH 7,3 eingestellt. Die Zellen ( $1 \times 10^7$ /ml) wurden im Wasserbad bei 37 °C und bei leichtem Schütteln für 30 min inkubiert. Danach wurden sie für 7 min auf Eis gestellt, 2 mal abzentifugiert (200 × g, 3 min, 4 °C), in eisgekühltem Kulturmedium mit 10 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> und 2 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und bis zu den Experimenten im Kühlschrank aufbewahrt. Bei den Experimenten in calciumfreien Medium wurden 3 mM EGTA zugesetzt. Bevor die Experimente gestartet wurden, mußten je

300 µl der Zellsuspension in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) pipettiert werden. Danach erwärmt sich die Zellen für 15 min auf die Raumtemperatur ( $22 \pm 1$  °C). Nach der Farbstoffbeladung wurden sie für maximal 1,5 h im Kühlschrank gelagert, bevor sie für die Versuche verwendet wurden.

Für die Videoanalyse wurden die HL-60 Zellen in speziellen Kulturschalen (Chamber slides, Nunc, Wiesbaden), die sich für die Untersuchung in einem inversen Mikroskop eignen, ausplattiert. Damit sich die Zellen anheften, wurde bei diesen Versuchen der FKS-Gehalt des Kulturmediums auf 2 % reduziert.

### Untersuchungen von HL-60 Zellen im Fluoreszenzspektrometer

Die Calciumkonzentration im Zytosol wurde bei Raumtemperatur in einem Fluoreszenzspektrometer (CytoFluor 2300, Millipore, Eschborn) bestimmt. Die Einstellungen des Monochromators waren  $485 \pm 10$  nm bei der Excitation und  $525 \pm 12$  nm bei der Emission. Die Calciumkonzentration wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \times \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)}$$

Dabei ist  $k_d$  die Dissoziationskonstante und  $F$  die im Experiment erhaltene Fluoreszenz.  $F_{\max}$  wurde immer nach den Experimenten durch die sequentielle Applikation von Calcium-Ionophor A23187 (10 µM) und Digitonin (30 µM) bestimmt.  $F_{\min}$  wurde in separaten Ansätzen mit HL-60 Zellen ermittelt, die nicht mit dem Farbstoff beladen waren. Der  $k_d$  Wert wurde der Literatur entnommen (Minta *et al.*, 1989; Latanzio, 1990) und ist in unserem Labor verifiziert worden (Dieterich, 1992). Alle Messungen wurden mit jeweils 3 Replikaten durchgeführt. Die untersuchten Organometalle und die verwendeten Pharmaka verändern *per se* die Fluoreszenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators nicht.

Das Fluoreszenzspektrometer bestimmt die Fluoreszenz der Proben bei maximaler zeitlicher Auflösung 8 mal in 34 s. Zur Bestimmung der Grundfluoreszenz und der maximalen Fluoreszenz wurde diese zeitliche Auflösung gewählt. Zur Bestimmung der Fluoreszenz von stimulierten Zellen wurde die zeitliche Auflösung auf 8 Meßpunkte in 60 s gesetzt. Bei dieser Einstellung bestimmt das Fluoreszenzspektrometer in 8 mal in 34 s die Fluoreszenz und pausiert dann bis zur

Vollendung des 60 s Intervalls. Die 8 Meßpunkte mit der anschließenden Pause gehen jeweils in die Abbildungen zur Calciumbestimmung ein.

### **Untersuchungen von HL-60 und NG108-15 Zellen mit Videoanalysen**

Die calciumabhängige Fluoreszenz von HL-60 und NG108-15 Zellen wurden mit einer hochempfindlichen CCD-Kamera (Kappa, Gleichen) und einem inversen Mikroskop (DMIL, Leica, Stuttgart) dargestellt. Das optische Bild des Mikroskops wird von der Kamera Zeile für Zeile abgetastet, anschließend in einzelne Bildpunkte zerlegt und in ein elektrisches Signal umgewandelt, wobei hellere Bereiche eine höhere Spannung bewirken. Das Videosignal wird dann von einem Analog-Digitalwandler (Quantimed 500, Leica, Bensheim) in ein digitales Signal konvertiert. Das resultierende digitale Videosignal besteht aus maximal 256 verschiedenen Grauwerten. Der Grauwertebereich erstreckt sich von 0-255, wobei 0 schwarz und 255 weiß ist. Um die Unterschiede zu verdeutlichen, wurden die Schwarzweißbilder mit einem Computerprogramm (Picture Publisher) in Falschfarbenbilder umgewandelt.

Da diese Methode keine Quantifizierung erlaubt und die Fluoreszenz zum einen von der Anregungsenergie und zum anderen von den Einstellungen der Kamera und der Bildanalysesoftware abhängig ist, wurden die Einstellungen standardisiert, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Im Falle der Kamera und der Bildanalyse war dies kein Problem. Die Anregungsenergie ist aber durch die Quecksilberhochdrucklampe, deren Leistung mit zunehmendem Lebensalter abnimmt, nicht ohne weiteres regulierbar. Deshalb wurde mit Hilfe von Uranglas, das als Standard diente und verschiedenen Graufiltern vor den Experimenten die gleiche Beleuchtungsstärke eingestellt.

Da keine Quantifizierung durchgeführt werden konnte, mußte auf Experimente, bei denen kleine Unterschiede der Fluoreszenz herausgearbeitet werden sollten, verzichtet werden. Auch Dosiswirkungsbeziehungen konnten aus diesem Grund nicht untersucht werden.

Bei den Videoanalysen wurden die Organometalle in der entsprechenden Konzentrationen mit einer Mikrokapillare bei einem konstanten Druck von 5 hPa, der von einem Mikroinjektor (Eppendorf, Hamburg) erzeugt wurde, appliziert. Die Kapillare wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Eppendorf, Hamburg) positioniert.

---

### Beladung der NG108-15 Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3

Zur Beladung mit dem Calciumindikator wurden die Zellen in Standard-Kulturmedium ohne FKS mit 2  $\mu\text{M}$  Fluo-3 (mit Pluronsäure s.o.) für 45 min im Brutschrank inkubiert. Dem Kulturmedium war 2,5 mM Probenecid zugesetzt worden, um zu verhindern, daß der Farbstoff wieder aus den Zellen austritt. Probenecid hemmt den Transport von organischen Anionen über die Membran (Steinberg *et al.*, 1987; Merritt *et al.*, 1990). Ohne diesen Zusatz war eine reproduzierbare Farbstoffbeladung der Zellen nicht möglich. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2 mal gewaschen und dann in Standard-Kulturmedium (pH 7,3) mit reduziertem FKS Gehalt (2 %) sowie 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM HEPES und 4 mM  $\text{NaHCO}_3$  aufgenommen. In Versuchen mit calciumfreiem Medium wurden 3 mM EGTA zugesetzt.

### Medien für spezielle Untersuchungen des Calciumhaushalts von HL-60 Zellen

Zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen der Organometalle wurden Medien benötigt, bei denen bestimmte Ionen durch Ersatzstoffe substituiert waren.

#### Natriumfreies Medium:

$\text{CaCl}_2$	2,0 mM
KCl	5,0 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4 mM
D-Glucose	11,1 mM
HEPES	10,0 mM
Cholinchlorid	140,0 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	4,5 mM
pH 7,3 mit KOH einstellen!	

Die anorganischen Salze entsprechen den Konzentrationen wie sie dem RPMI 1640 Medium zugesetzt werden. Auf den Zusatz von Aminosäuren, Vitaminen, FCS, Glutamin und Pyruvat wurde, um einen Eintrag von Natrium zu vermeiden, verzichtet.

Da das natriumfreie Medium ohne Aminosäuren, Vitamine usw. hergestellt worden war und ein Einfluß des Mediums auf die Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde ein

Kontrollmedium hergestellt, dem anstelle von Cholinchlorid Natriumchlorid (140 mM) zugesetzt war. Ansonsten entsprach es in seiner Zusammensetzung dem natriumfreien Medium.

### **Nominal calciumfreies Medium**

Kulturmedium mit 10 mM HEPES, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> und 0,54 mM EGTA wurde mit NaOH auf pH 7,3 eingestellt. Um eine Verarmung der Zellen an Calcium zu verhindern und einer Öffnung von Calciumkanälen nach dem kapazitiven Modell (siehe Einleitung) vorzubeugen, wurde die freie Calciumkonzentration des Kulturmediums mit EGTA auf ca. 100 nM eingestellt. Die Bestimmung der benötigten EGTA-Konzentration erfolgte durch Zugabe von EGTA zu einer Probe aus dem Medium. Zu dieser Probe, die 2 µM Fluo-3 enthielt, wurde schrittweise soviel EGTA zugegeben, bis die Fluoreszenz des Calcium-Fluo-3 Komplexe der gewünschten freien Calciumkonzentration entsprach. Diese Methode ist nicht quantitativ, sondern nur eine Annäherung. Mit Hilfe von Versuchen mit Calcium-Ionophor A23187 konnte aber gezeigt werden, daß sich der Calciumgehalt der intrazellulären Speicher in diesem Medium innerhalb von 15 min nicht verändert. In diesem Medium findet auch kein Calciuminflux aus dem extrazellulären Raum statt. Dies wurde durch Experimente gezeigt, in denen der durch Calcium-Ionophor induzierbare Calciuminflux ins Zytosol von Zellen, die für 15 min in nominal calciumfreien Medium inkubierten waren, mit dem von Zellen, die sofort nach der Überführung in ein calciumfreies Medium (3 mM EGTA) aufgenommen waren, verglichen wurde.

**Chloridfreies Medium:**

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	2,0 mM
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,4 mM
D-Glucose	11,1 mM
HEPES	10,0 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,5 mM
Natriumgluconat	140,0 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,0 mM
L-Glutamin	3,0 mM
Natriumpyruvat	1,0 mM

+ 10 % FKS, pH 7,3 mit NaOH einstellen!

Wie beim natriumfreien Medium wurde auch hier, um einen Effekt der Medienzusammensetzung auszuschließen, ein Kontrollmedium mit 140 mM NaCl verwendet.

**Die Herstellung der Überstände zur Untersuchung der Signalwirkung von löslichen Faktoren**

Die für den Versuch benötigte Anzahl ( $1 \times 10^7$  Zellen/Ansatz) differenzierter Zellen wurde bei  $200 \times g$  5 min abzentrifugiert, anschließend in Kulturmedium (1 ml) aufgenommen und in Kulturschalen ausplattiert. Danach wurden die Zellen für den gewünschten Zeitraum mit den Organometallen behandelt und anschließend bei  $2000 \times g$  30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet verworfen. Zur Untersuchung der Wirksamkeit dieser Überstände auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen wurden Zellen wie beschrieben mit Fluo-3 beladen. Die Zellen wurden dann aber nicht in 300  $\mu$ l, sondern in 150  $\mu$ l Kulturmedium aufgenommen und in Mikrotiterplatten pipettiert. Zu diesen Zellen wurden dann 150  $\mu$ l der jeweiligen Überstände gegeben und die Fluoreszenz während 10 min bestimmt.

## 2.4. Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes mit dem pH-Indikator BCECF-AM

Seit seiner Einführung (Rink *et al.*, 1982) wurde das Fluoreszeinderivat BCECF zu einem der meist genutzten Fluoreszenzindikatoren des intrazellulären pH-Wertes. Der Farbstoff wird wie Fluo-3 als lipophiler Ester eingesetzt, da dieser die Zellmembran durchqueren kann. Im Zytosol wird der Ester hydrolysiert und die entstandene freie Säure von BCECF wird dann aufgrund ihrer negativen Ladungen im Zytosol zurückgehalten. Zur Farbstoffbeladung wurden die Zellen ( $1 \times 10^7$ /ml) für 45 min mit  $5 \mu\text{M}$  BCECF-AM, dem das anionische Detergenz Pluronsäure (0,5 % v/v) zugesetzt worden war, im Wasserbad mit Kulturmedium ohne FKS inkubiert. Das Medium war mit 10 mM HEPES, und 4 mM  $\text{NaHCO}_3$  gepuffert und der pH-Wert war auf 7,3 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen 2 mal gewaschen und in einer entsprechenden Menge Medium mit 10 mM aufgenommen, so daß die Konzentration  $3,3 \times 10^6$  Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension (300  $\mu\text{l}$ ) wurde dann in die Mikrotiterplatten pipettiert.

Zur quantitativen Bestimmung des pH-Wertes muß der Farbstoff mit Licht von 439 nm und mit 505 nm Wellenlänge angeregt werden. Bei 439 nm ist die Fluoreszenz nur von der Konzentration, bei 505 nm nur vom pH-Wert abhängig, so daß man die Emissionswerte bei 530-540 nm messen und bei den unterschiedlichen Anregungswellenlängen ins Verhältnis setzen kann. Dadurch kann der pH-Wert unabhängig von der ins Zytosol aufgenommenen Farbstoffmenge bestimmt werden.

Die Kalibrierung erfolgt *in situ* mit der in der Literatur beschriebenen "Nigericin-KCl-Methode" (Thomas *et al.*, 1979; Rink *et al.*, 1982). Zu diesem Zweck werden die HL-60 Zellen zunächst mit BCECF-AM beladen und dann in Medium mit unterschiedlichem pH-Wert aufgenommen. Die Abstufung des pH-Wertes der Medien erfolgte in Schritten zu 0,3 pH-Einheiten und deckte den Bereich von pH 6,4-7,9 ab. Die Zellsuspension wurde daraufhin in Mikrotiterplatten pipettiert und mit Nigericin ( $10 \mu\text{M}$ ) und KCl (130 mM) versetzt. Nigericin ist ein Antibiotikum, das Protonen im Austausch gegen Kalium transportiert, so daß sich der pH-Wert im Zytosol dem pH-Wert im extrazellulären Raum angleicht. Damit der Kaliumgradient nicht zur treibenden Kraft für die Protonenaufnahme in die Zellen wird und dadurch zu viele Protonen ins Zytosol gelangen, wurde der Zellsuspension gleichzeitig mit Nigericin auch Kalium zugesetzt. Die Fluoreszenz wurde dann für 10 min gemessen, und aus den Emissionswerten bei beiden Anregungswellenlängen wurde das

Verhältnis Emission 505 nm/Emission 439 nm berechnet. Zwischen pH 6 und pH 8 nimmt dieses Verhältnis linear zu, so daß mittels linearer Regression eine Eichgerade berechnet und die Messung kalibriert werden konnte. Diese Eichung wurde für jeden Versuch neu durchgeführt.

Zur Messung wurde HL-60 Kulturmedium ohne Phenolrot mit 10 mM HEPES und 4 mM NaHCO<sub>3</sub> gepuffert und mit NaOH auf pH 7,3 eingestellt. Das bei den Versuchen benutzte chloridfreie Medium entspricht dem bei der Calciummessung beschriebenen Medium.

## 2.5. Verteilung der <sup>14</sup>C-Arachidonsäure innerhalb der Lipidklassen von HL-60 Zellen

### Markierung und Inkubation

Die für den Versuch benötigte Anzahl ( $1 \times 10^7$  Zellen/Ansatz) differenzierter Zellen wurde bei  $200 \times g$  5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 ml radioaktivem Markierungsmedium resuspendiert. Bei diesem Markierungsmedium handelt es sich um HL-60 Kulturmedium, das 92,5 kBq [1-<sup>14</sup>C]Arachidonsäure (spezifische Aktivität: 2,15 GBq/mmol) gelöst in 650 µl DMSO enthält. Aus diesem Medium wurden bei jedem Versuch 200 µl als Standard entnommen. Dieser Standard diente einerseits zur Überprüfung der eingesetzten Radioaktivität, andererseits wurde er zur Berechnung der Gesamtbilanz der Radioaktivität herangezogen. Die Zellen wurden anschließend für 24 h inkubiert. Dieser Zeitraum gewährleistet eine vollständige Aufnahme und eine gleichmäßige Verteilung der Arachidonsäure in den verschiedenen Lipidklassen der Membran (Froissart *et al.*, 1989; Krug & Culig, 1991).

Nach der Markierung wurden die Zellen abzentrifugiert ( $200 \times g$ , 5 min), einmal mit 5 ml Medium gewaschen, im entsprechenden Volumen (1 ml/Ansatz) Inkubationsmedium (entspricht einem Kulturmedium mit 3,3 % FKS) aufgenommen und schließlich auf Petrischalen verteilt. Aus dem Überstand der Zentrifugation und aus der Waschlösung wurden je 3 mal 1 ml entnommen. Diese Proben wurden später im Flüssigkeitsszintillationszähler (1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB) gemessen und zur Bilanzierung der Radioaktivität verwendet. Nach mindestens 30 minütiger Ruhephase wurden die Organometalle zugegeben und die Zellen für 30 min inkubiert.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem Vehikel inkubiert, als Positivkontrollen wurde das Calcium-Ionophor A23187 (10  $\mu$ M für 10 min) verwendet.

## **Extraktion der Lipide**

Die Lipide wurden nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Nach der Inkubation wurde der gesamte Inhalt einer Petrischale mit einer Transferpipette (Sarstedt) in ein zentrifugierbares Duranglas-Röhrchen (Bender & Hobein) überführt, in das 1,25 ml eiskaltes Chloroform vorgelegt worden war. Es bildeten sich sofort zwei Phasen aus, die mit Hilfe eines Vortex (Bender & Hobein) kurz durchmischt wurden. Die Petrischalen wurden zweimal mit 1,25 ml eiskaltem Methanol gewaschen. Diese Waschlösung wurde ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach erneuter Durchmischung wurden 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml 0,2 %ige Ameisensäure zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde nochmals durchmischt und mindestens 5 min auf Eis stehen gelassen. Zur besseren Phasentrennung wurden die Röhrchen schließlich 5 min mit  $500 \times g$  zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde entnommen und bei 37 °C unter ständiger Stickstoffbegasung an einem Abdampfgerät mit Metallblock-Thermostat (Labor Technik Barkey) völlig getrocknet. Die Proben wurden dann in 80  $\mu$ l Chloroform aufgenommen und unter Stickstoff in verschließbaren Glasröhrchen über Nacht bei -20 °C aufbewahrt.

## **Dünnschichtchromatographie**

Die Laufkammern wurden am Tag vor dem auftragen der Extrakte mit dem entsprechenden Laufmittel gesättigt. Die Dünnschichtplatten (SIL G Polygram, Macherey & Nagel, Nr. 805013) wurden in einem Chloroform/Methanol Gemisch (1:2 v/v) vorlaufen gelassen und für mindestens 30 min bei 110 °C aktiviert.

Die in Chloroform aufbewahrten Extrakte wurden mit einer Pipette unter ständiger Begasung mit Stickstoff aufgetragen. Die Glasröhrchen wurden nochmals mit 80  $\mu$ l Chloroform gespült, und auch diese Lösung wurde aufgetragen. Für die optimale Trennung der Lipide hat sich die Kombination der folgenden Laufmittel bewährt (Krug & Culig, 1991):

---

**Laufmittel 1:**

Gemisch aus Chloroform / Methanol / Essigsäure / Wasser im Verhältnis 56 : 33 : 9 : 2.

Die Front lief vom Auftragungspunkt 11 cm nach oben, der erste Lauf dauerte etwa 70 min. Hier erfolgte die Trennung der Phospholipide. Neutrallipide, freie Fettsäuren und deren Metabolite liefen mit der Front.

**Laufmittel 2:**

Gemisch aus Hexan / Ether / Essigsäure im Verhältnis 80 : 20 : 1.

Hier lief die Front bis an den oberen Plattenrand, dieser Lauf dauerte ungefähr 50 Min. Hier trennten sich die Neutrallipide, die Fettsäuren und deren Metabolite auf.

Die Dünnschichtplatten wurden zwischen erstem und zweitem und nach dem zweiten Lauf mit dem Fön getrocknet. Nach dem zweiten Lauf wurde die Platte für 5 min in die Iodkammer gestellt. Die reversible Addition von Iod an die C-C-Doppelbindungen der aufgetrennten Lipide führt zur Bildung von gelblich-braunen Banden. Diese Banden wurden mit einem weichen Bleistift umrandet.

**Autoradiographie**

Auf die Dünnschichtplatten wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup> MP, Amersham International, Braunschweig) aufgelegt. Der Film wurde in einer Fototasche 4 Tage bei -20 °C exponiert.

**Auswertung**

Aufgrund der  $R_f$ -Werte der Standardsubstanzen wurden die bei der Autoradiographie entstandenen Banden identifiziert. Die mit einem weichen Bleistift umrandeten Banden auf der Dünnschichtplatte konnten so zugeordnet werden. Dann wurden die Banden der verschiedenen Lipide aus der Dünnschichtplatte ausgeschnitten und in Szintillationsgefäße (Minis 2000, Zinsser, Frankfurt/Main) sortiert. Jedes Gefäß wurde mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick Safe A, Zinsser, Frankfurt/Main) gefüllt und gut geschüttelt. Die Proben wurden schließlich im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Meßdauer betrug 2 min. Mit Hilfe eines Excel-Datenblattes wurden die prozentualen Anteile der Aktivität der einzelnen Banden auf die

Gesamtaktivität errechnet. Die Wiederfindungsrate lag bei allen Versuchen bei über 75 % der Gesamtaktivität.

## **2.6. Statistik**

Von den experimentell ermittelten Daten wurden jeweils die Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung berechnet. Diese Mittelwerte wurden dann mit den Mittelwerten der entsprechenden Kontrollbehandlung mit Hilfe des Student-*t*-Tests verglichen. Die verwendeten Signifikanzniveaus werden bei den Versuchen angegeben.

---



### 3. ERGEBNISSE

Die neurotoxische und immunotoxische Wirkung der Organometalle ist bekannt. Um die Wirkungen der Organometalle auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, wurden zwei Zelllinien als Modellsysteme gewählt. Die zu Granulozyten differenzierten HL-60 Zellen dienten als Modell zur Untersuchung der Immunotoxizität und die differenzierten NG108-15 Zellen zur Untersuchung der Neurotoxizität der Xenobiotika.

#### 3.1. Untersuchungen der zellulären Signaltransduktion am Beispiel des Rezeptoragonisten fMLP

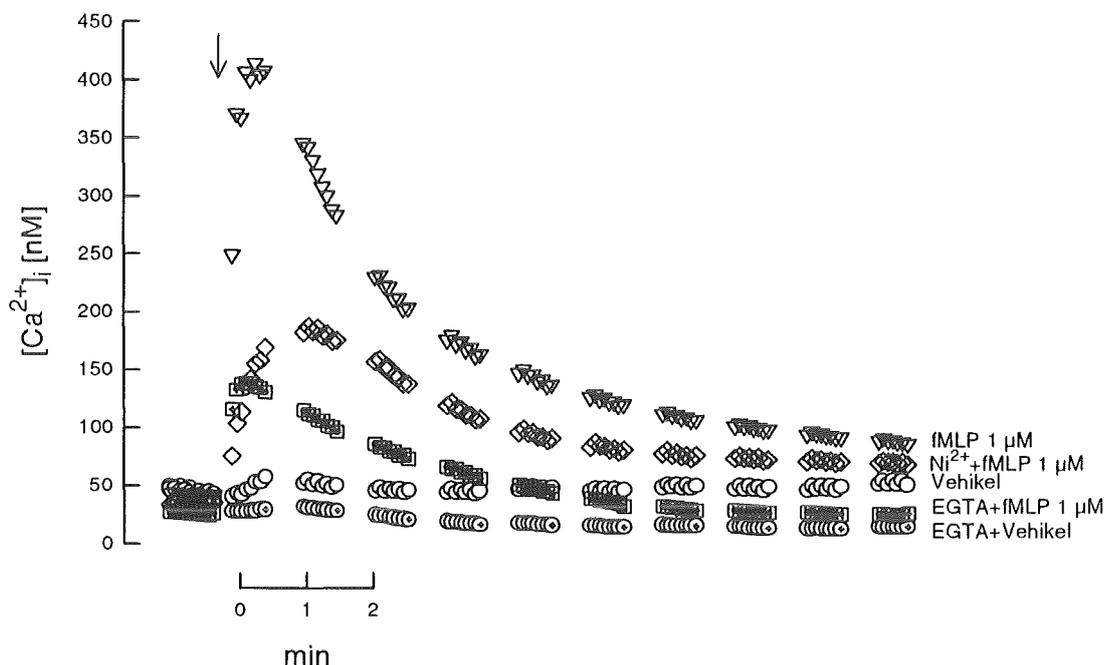
HL-60 Zellen wurden immer wieder als Modellsysteme für humane neutrophile Granulozyten herangezogen (Lew *et al.*, 1986, Krause *et al.*, 1989). Insbesondere die Funktion des Calciumsignals zur Aktivierung dieser Zellen wurde eingehend untersucht. Differenzierte HL-60 Zellen besitzen Rezeptoren für das chemotaktische Peptid fMLP, die über G-Proteine an die PLC gekoppelt sind. Die Aktivierung der PLC und die damit verbundene Bildung von IP<sub>3</sub> führen zur Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Calciosomen oder ER) und zum Calciuminflux aus dem extrazellulären Raum. Diese bekannten Eigenschaften der HL-60 Zellen wurden genutzt, um die Meßmethodik im Labor zu etablieren und die Ergebnisse zu verifizieren. Außerdem eignet sich der physiologische Stimulus zum Vergleich mit den Effekten der untersuchten Xenobiotika.

Wurden die HL-60 Zellen mit dem Tripeptid fMLP (1 µM) stimuliert, so induziert es unmittelbar nach seiner Applikation einen Calciumeinstrom ins Zytosol (Abb. 5). Innerhalb von wenigen Sekunden wurde die maximale Konzentration von freien Calciumionen im Zytosol erreicht (ca. 400 nM). Im Anschluß an den schnellen Anstieg folgte eine Regulationsphase, in der die Zellen innerhalb einiger Minuten den Calciumspiegel auf einen Wert senkten, der etwas über dem basalen Calciumspiegel lag. Das von fMLP induzierte Calciumsignal setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, dem aus intrazellulären Speichern freigesetzten und dem von außen einströmenden Calcium. Der aus dem ER freigesetzte Anteil ließ sich sehr gut im calciumfreien Medium (die HL-60 Zellen wurden vor der Applikation von fMLP für 3-5 Minuten im EGTA-Medium inkubiert) demonstrieren. Das transiente Calciumsignal wies unter diesen Bedingungen ein

---

deutlich niedrigeres Maximum (ca. 120 nM) auf (Abb. 5) auf. Aus diesen Versuchen wurde deutlich, daß das extrazelluläre Calcium einen größeren Anteil am Calciumeinstrom ins Zytosol hat.

Zusätzlich ließ sich anhand der Stimulierung mit fMLP auch die Wirkung des Calciumkanalblockers Nickel darstellen. Die Vorinkubation mit Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ , 10 mM, 2-3 min) blockierte den durch fMLP induzierbaren Calciumeinstrom durch die Plasmamembran nahezu vollständig, während die Freisetzung aus intrazellulären Speichern unverändert blieb. In diesen Experimenten bestätigt sich, daß  $\text{Ni}^{2+}$  ein potenter Inhibitor von Calciumkanälen ist. Der Terminus Calciumkanal wird weiterhin Verwendung finden, auch wenn die Calciumkanäle von HL-60 Zellen noch nicht ausreichend charakterisiert sind. Sie werden in der Literatur auch als unspezifische Kationenkanäle bezeichnet, da sie neben Calciumionen auch eine Leitfähigkeit für Natriumionen besitzen sollen (Krautwurst *et al.*, 1992).



**Abb. 5: Die Wirkung des chemotaktischen Peptids fMLP auf den zytosolischen Calciumspiegel von HL-60 Zellen.**

Differenzierte HL-60 Zellen wurden mit Fluo-3 beladen und mit fMLP zum angegebenen Zeitpunkt (Pfeil) unter verschiedenen Bedingungen stimuliert. Der Effekt von fMLP im calciumhaltigen (2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), im calciumfreien Medium (5 mM EGTA) und nach Vorbehandlung mit  $\text{Ni}^{2+}$  (10 mM) ist dargestellt. Zusätzlich sind Meßergebnisse nach der Behandlung mit dem Vehikel (Dimethylsulfoxid) im calciumhaltigen Medium abgebildet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 Experimente.

### 3.2. Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels in HL-60 Zellen durch Organometalle

Die meisten der dargestellten Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen mit dem Fluoreszenzspektrometer. Um Wechselwirkungen der Organometalle mit dem Calciumindikator Fluo-3 ausschließen zu können, wurden Experimente mit der freien Säure des Fluoreszenzfarbstoffes in einem calciumhaltigen Medium durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Organometallverbindungen die Fluoreszenz des Fluo-3/Calcium-Komplexes nicht beeinflussen (Daten nicht gezeigt).

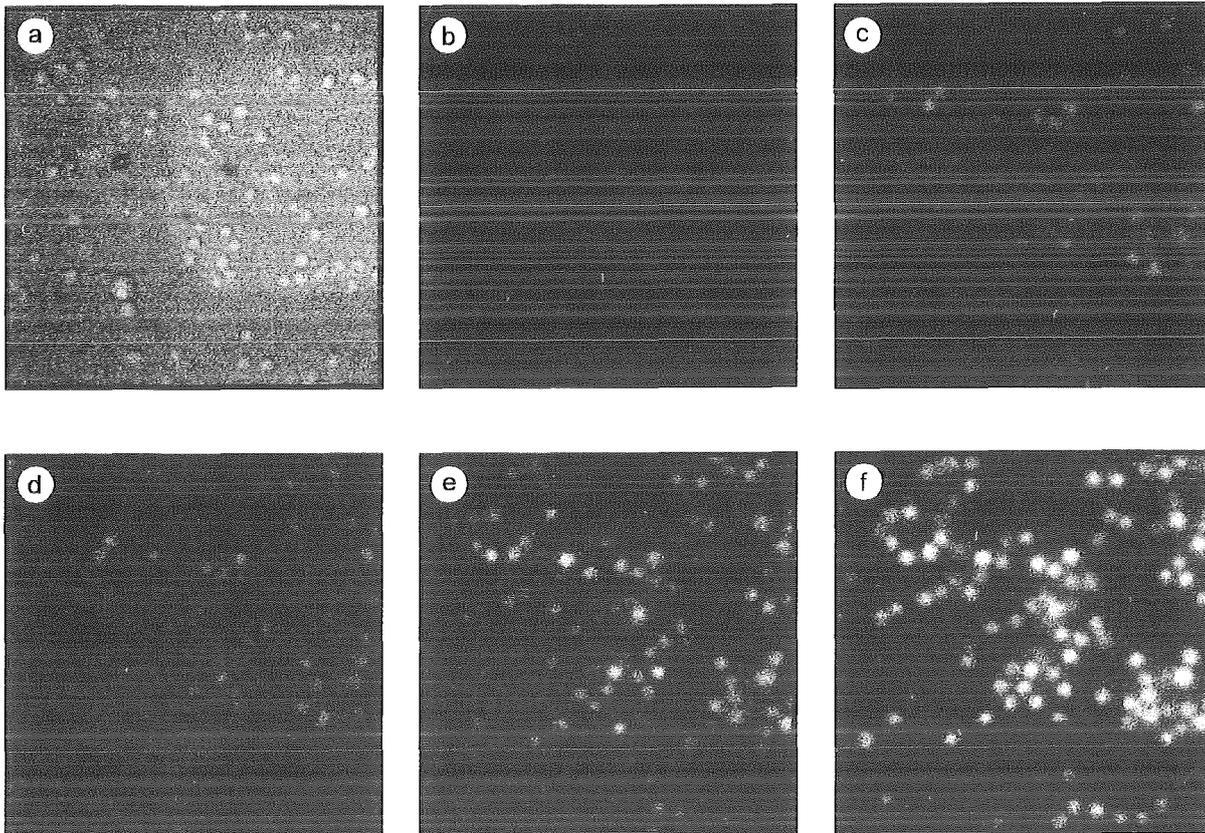
Um die Wirkung der Organometalle auf den Calciumhaushalt untersuchen zu können, wurden HL-60 Zellen mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen. Zunächst erfolgte die Bestimmung der basalen Calciumkonzentration. Nach der Applikation der Organometalle wurde die Emission des Farbstoffs für 10 min im Fluoreszenzspektrometer gemessen. In diesen Studien wird die Reaktion einer großen Zellpopulation aufgenommen und ausgewertet, so daß individuelle Unterschiede nicht detektiert werden können. Es ist auch nicht unmittelbar möglich, ortsspezifisch zu bestimmen, wo die Fluoreszenz entsteht. Würden die Xenobiotika die Integrität der Plasmamembran verändern, könnte die Fluoreszenz auch dadurch entstehen, daß der Farbstoff aus den Zellen in den extrazellulären Raum diffundiert und dort Calcium bindet.

Mit Hilfe von Videoanalysen kann die Reaktion von einzelnen Zellen untersucht und gleichzeitig der Ort der Fluoreszenzemission lokalisiert werden. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, reagierten die Zellen individuell unterschiedlich auf die Behandlung mit Organometallen. Das Fluoreszenzspektrometer liefert somit einen Durchschnittswert der untersuchten Zellpopulation, während das Videoimaging die individuellen Reaktionen der Zellen zeigen kann.

Es ist mit Sicherheit auszuschließen, daß der Calciumindikator im Untersuchungszeitraum durch unspezifische Schäden die an der Plasmamembran durch die Organometalle ausgelöst werden, aus den Zellen ins Medium gelangt. Dies konnte zum einen mit den Videoanalysen gezeigt werden, denn die Fluoreszenz von Fluo-3 blieb nach einer Organometallbehandlung auf die Zellen beschränkt (Abb. 6). Zum anderen durch Experimente mit dem Fluoreszenzspektrometer anhand von  $\text{Ni}^{2+}$  und EGTA. Beide Substanzen haben die Eigenschaft, die Fluoreszenz des Farbstoffs schlagartig zu löschen, wenn sie in großem Überschuß zu einer Fluo-3 Lösung, die auch Calcium

---

enthält, gegeben werden. Begründet ist dies darin, daß EGTA mit Fluo-3 um Calcium konkurriert und  $\text{Ni}^{2+}$  anstelle von Calcium an den Farbstoff bindet. Dabei erhöht  $\text{Ca}^{2+}$  die Fluoreszenz während sie durch  $\text{Ni}^{2+}$  gelöscht wird. Wurde  $\text{Ni}^{2+}$  oder EGTA zu einer Suspension von mit Organometallen behandelten Zellen gegeben, blieb die Fluoreszenz zunächst unverändert, da der Farbstoff nicht in den extrazellulären Raum gelangt war (Daten nicht gezeigt).

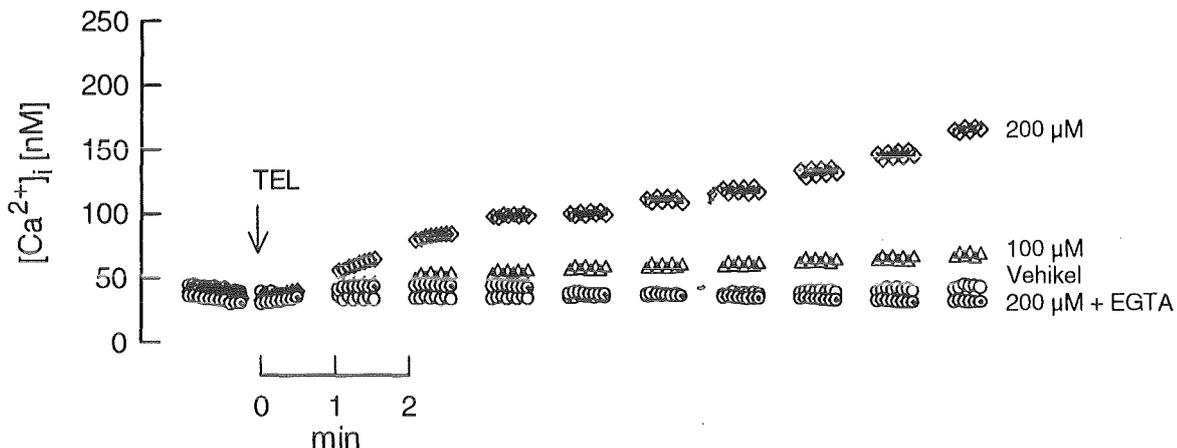


**Abb. 6: Die Wirkung von TEL auf die calciumabhängige Fluoreszenz von HL-60 Zellen.**

Videoaufnahmen von differenzierten HL-60 Zellen, die mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen und anschließend mit TEL (200  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden. Die Aufnahmen zeigen die Zellen im Durchlicht (a), sowie die calciumabhängige Fluoreszenz der unbehandelten Zellen (b), sowie 2 (c), 5 (d), 8 (e) und 10 min (f) nach der Behandlung mit TEL. Die Einstellungen der Filter waren für die Anregung 485 nm und für die Emission 525 nm.

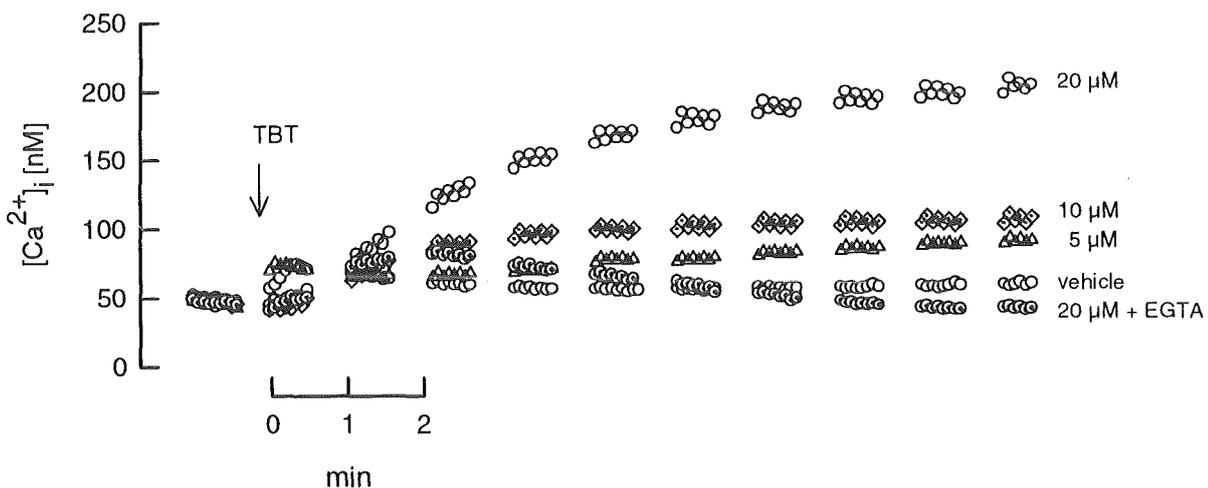
Alle untersuchten Verbindungen, mit Ausnahme von TMT, erhöhten innerhalb von 10 min die zytosolische Calciumkonzentration (Tab. 2 + 3). Der Effekt war von der Konzentration und der Struktur der Xenobiotika abhängig. Jede Substanz induzierte in einer bestimmten Konzentration eine Erhöhung der Calciumkonzentration. Im Gegensatz zur Reaktion auf das chemotaktische Peptid fMLP (Abb. 5), das eine transiente Erhöhung des  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzierte, bewirkten die Organometalle eine persistente Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den HL-60 Zellen. Ausgehend vom basalen Calciumspiegel (ca. 50 nM) stieg die Konzentration der freien Calciumionen stetig an und

erreichte schon nach 10 min Werte um 170 nM im Fall von TEL (Abb. 7) und mehr als 200 nM durch Behandlung mit TBT (Abb. 8). Die Darstellungen, die stellvertretend für alle hier untersuchten Verbindungen stehen, zeigen den typischen zeitlichen Anstieg der zytosolischen freien Calciumkonzentration, wie er von den Organometallen verursacht wird.



**Abb. 7: Die Kinetik der Wirkung von TEL auf die zytosolische freie Calciumkonzentration von HL-60 Zellen.**

HL-60 Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 beladen und mit TEL bzw. dem Vehikel ( $H_2O$ ) in calciumhaltigem Medium ( $2\text{ mM } Ca^{2+}$ ) und calciumfreiem Medium ( $2\text{ mM EGTA}$ ) behandelt. Aus den im Fluoreszenzspektrometer gemessenen Daten wurde die Calciumkonzentration berechnet. Die gezeigten Kurven sind Mittelwerte aus jeweils drei Replikaten und repräsentativ für die in Tabelle 2 aufgeführten Daten.



**Abb. 8: Die Kinetik der Wirkung von TBT auf den Calciumhaushalt von HL-60 Zellen.**

HL-60 Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 beladen und mit TBT bzw. dem Vehikel (Ethanol) in calciumhaltigem Medium ( $2\text{ mM } Ca^{2+}$ ) und calciumfreiem Medium ( $2\text{ mM EGTA}$ ) behandelt. Aus den im Fluoreszenzspektrometer gemessenen Daten wurde die Calciumkonzentration berechnet. Die gezeigten Kurven sind Mittelwerte aus jeweils drei Replikaten und repräsentativ für die in Tabelle 3 aufgeführten Daten.

Die Organometalle lassen sich aufgrund ihrer Potenz, die  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen wie folgt ordnen:

Organozinnverbindungen

Organobleiverbindungen

TMT < DBT < TET < TPT < TBT < TBTO

TML < TEL < TPhL

Die Effektivität der untersuchten trialkylierten Verbindungen die  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen, stieg mit zunehmender Kohlenstoffzahl der Alkylketten an. Unter den getesteten Zinnverbindungen ist TBT unter den Bleiverbindungen ist TEL die wirksamste Substanz. Die Wirksamkeit der Substanzen wird auch durch das zentrale Metallatom vermittelt, da die Bleiverbindungen mit demselben Alkylierungsgrad wie Zinnverbindungen die  $[Ca^{2+}]_i$  stärker erhöhen.

**Tab. 2: Die Wirkung von Organobleiverbindungen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen.**

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde nach 10 minütiger Behandlung mit den Organobleiverbindungen bzw. deren Lösungsmitteln (Kontrollen) in calciumhaltigem Medium (2 mM  $Ca^{2+}$ ) und in calciumfreien Medium (5 mM EGTA) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{X}$ ) und Standardabweichungen (SD) von 4 - 12 Experimenten. Die gekennzeichneten Werte (\*) sind signifikant von den Kontrollwerten verschieden ( $p < 0,025$ ).

Substanz	Behandlung		$[Ca^{2+}]_i$ [nM] $\bar{X} \pm SD$
	Konzentration [ $\mu$ M]		
basal	-		53 $\pm$ 8
Kontrolle	-		47 $\pm$ 4
TML	100		52 $\pm$ 7
TML	200		61 $\pm$ 12
TML	500		92* $\pm$ 18
EGTA+TML	500		28 $\pm$ 4
Kontrolle	-		43 $\pm$ 9
TEL	50		48 $\pm$ 10
TEL	100		71* $\pm$ 35
TEL	200		166* $\pm$ 88
EGTA+TEL	200		31 $\pm$ 16
Kontrolle	-		61 $\pm$ 11
TPhL	5		87 $\pm$ 30
TPhL	10		110* $\pm$ 39
TPhL	20		153* $\pm$ 38
EGTA+TPhL	20		29 $\pm$ 12

**Tab. 3: Die Wirkung von Organozinnverbindungen auf den Calciumhaushalt von HL-60 Zellen.**

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde nach 10 minütiger Behandlung mit den Zinnverbindungen bzw. deren Lösungsmitteln (Kontrollen) im calciumhaltigem Medium (2 mM  $Ca^{2+}$ ) und im calciumfreien Medium (5 mM EGTA) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) von 2 - 10 Experimenten. Die Effekte wurden im Vergleich zu den Kontrollen auf Signifikanz getestet. Die signifikanten Werte sind gekennzeichnet:  $p < 0,025$  (\*).

Substanz	Behandlung		$[Ca^{2+}]_i$ [nM] $\bar{x} \pm SD$
	Konzentration [ $\mu$ M]		
Kontrolle	-		51 $\pm$ 8
DBT	200		66 $\pm$ 14
DBT	500		71* $\pm$ 15
EGTA+DBT	500		36 $\pm$ 9
TMT	2000		50 $\pm$ 0
Kontrolle	-		51 $\pm$ 8
TET	100		64 $\pm$ 14
TET	250		114* $\pm$ 25
TET	500		190* $\pm$ 45
EGTA+TET	500		25 $\pm$ 2
Kontrolle	-		64 $\pm$ 12
TPT	10		112* $\pm$ 25
TPT	20		123* $\pm$ 21
TPT	40		137* $\pm$ 28
EGTA+TPT	40		25 $\pm$ 2
Kontrolle	-		61 $\pm$ 11
TBT	5		87 $\pm$ 30
TBT	10		135* $\pm$ 23
TBT	20		212* $\pm$ 42
EGTA+TBT	20		30 $\pm$ 4
Kontrolle	-		63 $\pm$ 13
TBTO	10		115* $\pm$ 40
TBTO	20		225* $\pm$ 45
EGTA+TBTO	20		40 $\pm$ 4

### 3.3. Mechanistische Studien zur Wirkung der Organometalle auf die $[Ca^{2+}]_i$

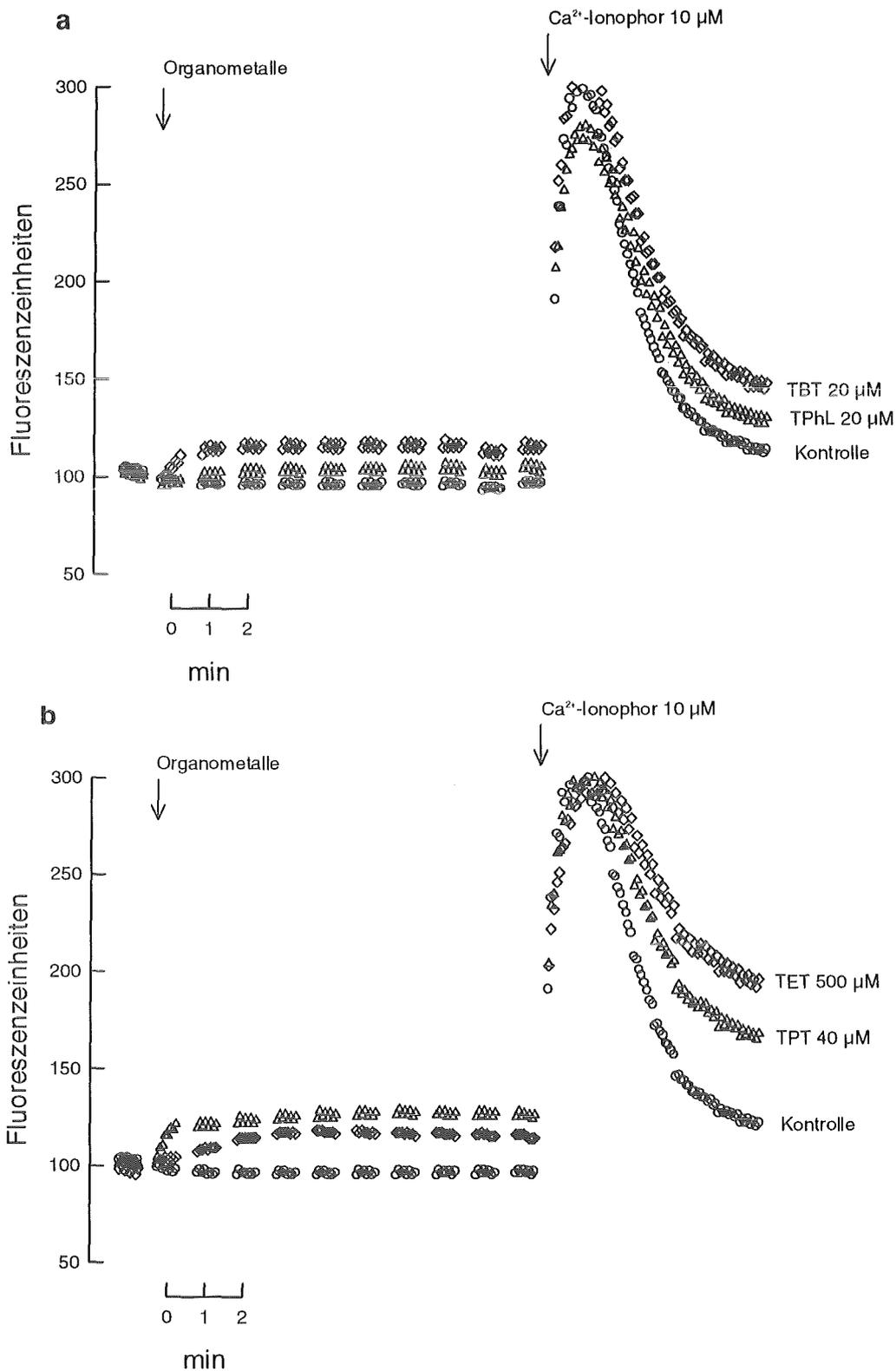
Grundsätzlich sind mehrere Mechanismen denkbar die zur Veränderung der zytosolischen freien Calciumkonzentration von Zellen führen können. Xenobiotika können die Calciumkonzentration von Zellen beeinträchtigen indem sie mit Proteinen, die Calcium transportieren, leiten oder binden, in Wechselwirkung treten. Als weiterer Mechanismus ist die Beeinträchtigung des Energiehaushalts der Zellen zu nennen, da die  $Ca^{2+}$ -ATPasen, die den Calciumgradienten an

Membranen aufrechterhalten ATP benötigen. Eine unspezifische Aktivierung, oder Hemmung von Signaltransduktionswegen, in denen Calcium eine Rolle spielt, könnte ebenfalls durch die Organometalle verursacht sein. Zusätzlich könnten Änderungen des intrazellulären pH-Wertes die Pufferkapazität von calciumbindenden Proteinen erniedrigen oder erhöhen.

### **3.3.1. Der organometall-induzierte Calciuminflux ins Zytosol: Untersuchungen zur Quelle des Calciums**

Die beiden Quellen, aus denen Calcium ins Zytosol einströmt sind das extrazelluläre Calcium, das beispielsweise durch Kanäle in die Zelle gelangt und die intrazellulären Speichern, insbesondere das ER oder die Calciosomen. Hinweise auf die wichtige Rolle des extrazellulären Calciums im Zusammenhang mit den Organometallwirkungen, gab es schon aus den Untersuchungen zur Arachidonsäurefreisetzung in calciumfreiem Medium (Käfer & Krug, 1994). Die Wirkung von TBT und TEL auf diesen Parameter wurde unter calciumfreien Bedingungen völlig verhindert (Abb. 15 + 16). Wie aus den Tabellen 2 + 3 und den Abbildungen 7 + 8 hervorgeht, induzieren die Xenobiotika in calciumfreiem Medium keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Dies war keinesfalls auf die Komplexierung der Organometalle zurückzuführen, da bekannt ist, daß EGTA mit den Organometallen keine Komplexe bilden kann (Röderer, 1983).

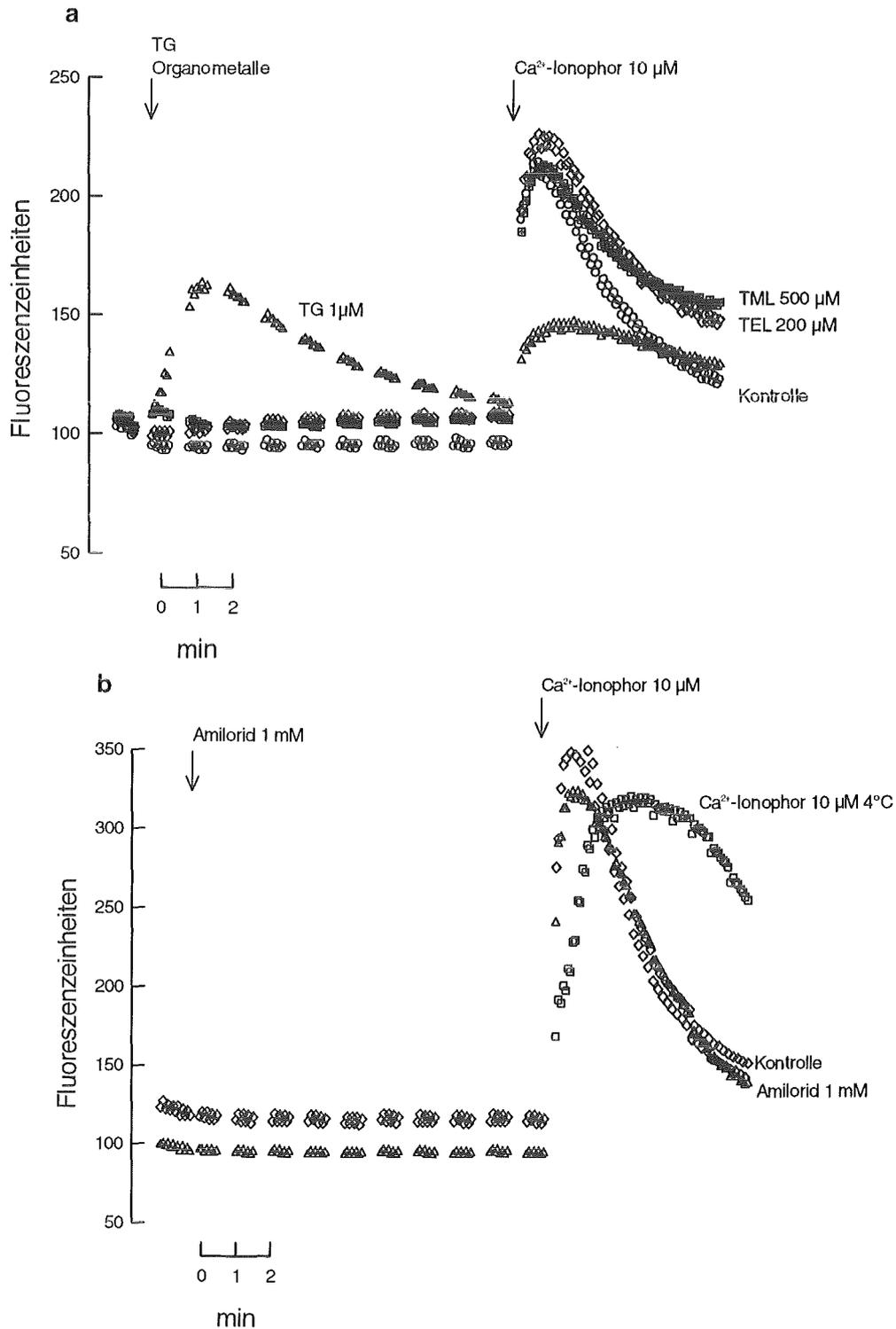
Im Gegensatz zu den Organometallen induzierten Substanzen wie das chemotaktische Peptid fMLP (Abb. 5), Calcium-Ionophor A23187 (Abb. 9) und Thapsigargin (Hemmer der  $Ca^{2+}$ -ATPase des ER, Abb. 10) unter calciumfreien Bedingungen einen Calciumeinstrom ins Zytosol, da sie Calcium sehr schnell aus intrazellulären Speichern freisetzen. Die Ergebnisse geben somit einen ersten Anhaltspunkt auf den Wirkungsmechanismus der Organometalle. Sie bewirken offensichtlich nicht wie Hormone oder Wachstumsfaktoren eine schnelle Freisetzung von Calcium aus dem ER, der bei den Rezeptoragonisten typisch für die erster Phase der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  ist und dadurch zustande kommt, daß Calcium freigesetzt wird, nachdem  $IP_3$  an seine Rezeptoren gebunden und Calciumkanäle geöffnet hat. Die Organometalle könnten demnach durch Interaktion, Modifikation oder Nachahmung einer der



**Abb. 9: Die Wirkung der Organometalle auf die intrazellulären Calciumspeicher.**

Mit DMSO differenzierte HL-60 Zellen, die mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-3 beladen waren, wurden nach verschiedenen Vorbehandlungen mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophor in nominal Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium behandelt.

Zellen die für 10 min mit Organometallen (a: TBT 20 μM, TPhL 20 μM; b: TET 500 μM; TPT 40 μM) vorinkubiert waren und unbehandelte Zellen (Kontrollen), wurde zum Entleeren der intrazellulären Calciumspeicher mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophor behandelt. Da bei diesen Versuchen die Calciumkonzentration nicht quantifizierbar war, wurden die gemessenen Fluoreszenzeinheiten dargestellt. Die gezeigten Ergebnisse sind die Mittelwerte aus jeweils drei Replikaten und stehen repräsentativ für 3-5 Experimente.



**Abb. 10: Die Wirkung der Organometalle auf die intrazellulären Calciumspeicher.**

Mit DMSO differenzierte HL-60 Zellen, die mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fluo-3 beladen worden waren, wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophor und Thapsigargin (TG) in nominal Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium behandelt.

a: Zellen, die für 10 min mit Organometallen (TML 500 μM, TEL 200 μM) vorinkubiert waren, und unbehandelte Zellen (Kontrollen) wurde zum Entleeren der intrazellulären Calciumspeicher mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophor behandelt. Um die Validität der Methode nachzuweisen, wurden weitere Zellen mit Thapsigargin (Inhibitor der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des ER) behandelt.

b: Die Zellen wurden unbehandelt (Kontrolle) nach Vorinkubation mit Amilorid und nach einer Vorkühlung auf 4 °C mit Ca<sup>2+</sup>-Ionophor behandelt um die intrazellulären Speicher zu entleeren.

Da bei diesen Versuchen die Calciumkonzentration nicht quantifizierbar war, wurden die gemessenen Fluoreszenzeinheiten dargestellt. Die gezeigten Ergebnisse sind die Mittelwerte von jeweils drei Replikaten und repräsentativ für 3-5 Experimente.

Signaltransduktionskomponenten, die letztendlich zur Bildung von  $IP_3$  führen, einen Calciumeinstrom ins Zytosol induzieren. Diese potentiellen Mechanismen wurden durch entsprechende Experimente in die Untersuchungen einbezogen.

Um den Einfluß der Xenobiotika auf die intrazellulären Speicher zu testen, wurden die HL-60 Zellen nach der Beladung mit Fluo-3 in ein nominal calciumfreies Medium aufgenommen. Dieses Medium enthielt noch Spuren von freiem  $Ca^{2+}$ , so daß die Calciumkonzentration in den Zellen ungefähr der im extrazellulären Raum entsprach. Dadurch sollte erstens verhindert werden, daß die Zellen durch Diffusion Calcium verlieren und zweitens, daß die Behandlung mit calciumaktivierenden Wirkstoffen einen Einstrom aus dem extrazellulären Raum induziert. Dieses Medium eignet sich durch seine Eigenschaften zur Untersuchung der Wirkung der Organometalle auf die intrazellulären Calciumspeicher.

Wie aus den Abbildungen 9 + 10 hervorgeht, bewirken die Organometalle in diesem, wie auch im calciumfreien Medium (Tab. 2 + 3) keine Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß eine schleichende Entleerung der Speicher stattfindet. Die Zellen könnten den langsamen Calciumverlust durch den Transport von Calcium aus den Zellen mittels  $Ca^{2+}$ -ATPasen ausgleichen und die Entleerung der Speicher würde dadurch unbemerkt bleiben. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde Calcium aus den intrazellulären Speichern im Anschluß an die Behandlung mit den Organometallen freigesetzt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit  $Ca^{2+}$ -Ionophor behandelt.  $Ca^{2+}$ -Ionophor gelangt in alle zellulären Membranen und ermöglicht dadurch einen Calciumstrom entlang den bestehenden Konzentrationsgradienten (Mitochondrien, ER) ins Zytosol. Wie in den Abbildungen 9 + 10 zu sehen ist, induzierte  $Ca^{2+}$ -Ionophor nach seiner Applikation einen raschen Anstieg der calciumabhängigen Fluoreszenz, der innerhalb von 4-5 min wieder auf den Ausgangswert zurückging. Die Vorinkubation mit den Organometallen veränderte den durch  $Ca^{2+}$ -Ionophor induzierbaren Fluoreszenzanstieg und die maximale Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollen nicht. Es wird offensichtlich, daß durch keines der untersuchten Organometalle Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wurde.

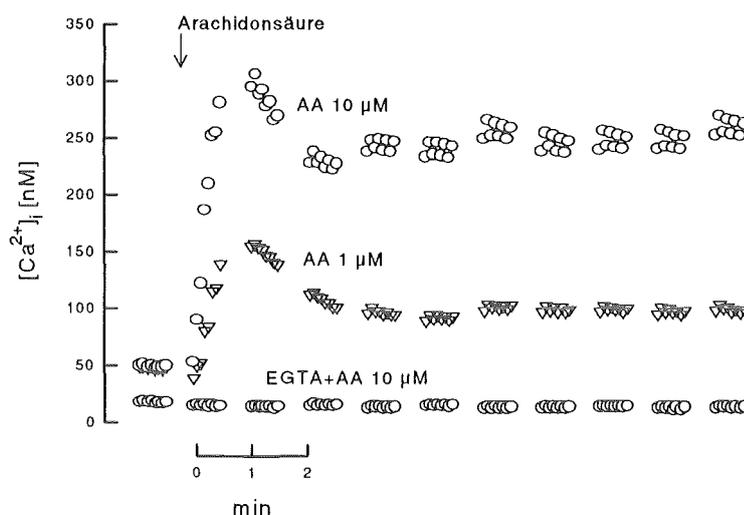
Die Validität der Methode wurde mit Thapsigargin, das hochspezifisch die  $Ca^{2+}$ -ATPase des ER hemmt und dadurch diesen Calciumspeicher entleert, nachgewiesen. Nach dessen Applikation

stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  rasch an, da Calcium aus dem ER diffundierte, und sank dann langsam wieder ab (Abb. 10 a). Das im Anschluß durch  $Ca^{2+}$ -Ionophor induzierbare Fluoreszenzmaximum war deutlich niedriger und entsprach im wesentlichen der Calciumfreisetzung aus den Mitochondrien.

### 3.3.2. Untersuchung der Komponenten der Calcium-Signalwege

Neben den schon angesprochenen Stimuli, die nach der Bildung von  $IP_3$  die Entleerung der intrazellulären Calciumspeicher bewirken, existieren noch weitere Hormone, bzw. Mediatoren, die einen Anstieg der zytosolischen freien Calciumkonzentration induzieren, ohne Calcium aus intrazellulären Speichern freizusetzen. Ein solches Beispiel ist Histamin. In HL-60 Zellen aktiviert Histamin, nachdem es an einen G-protein-gekoppelten Rezeptor gebunden hat, einen Calciumstrom durch die Plasmamembran (Seifert *et al.*, 1994).

In der Literatur wird Arachidonsäure immer wieder im Zusammenhang mit der Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  diskutiert. Deshalb sollte geprüft werden, ob Arachidonsäure, deren Freisetzung durch die Organometalle induziert wird, den  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen beeinflusst. Wie aus Abbildung 11 hervorgeht, induziert Arachidonsäure einen raschen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Allerdings blieb die Calciumkonzentration vor allem nach der Behandlung mit 10  $\mu M$  Arachidonsäure deutlich über dem ursprünglichen basalen Calciumspiegel der unbehandelten Zellen.

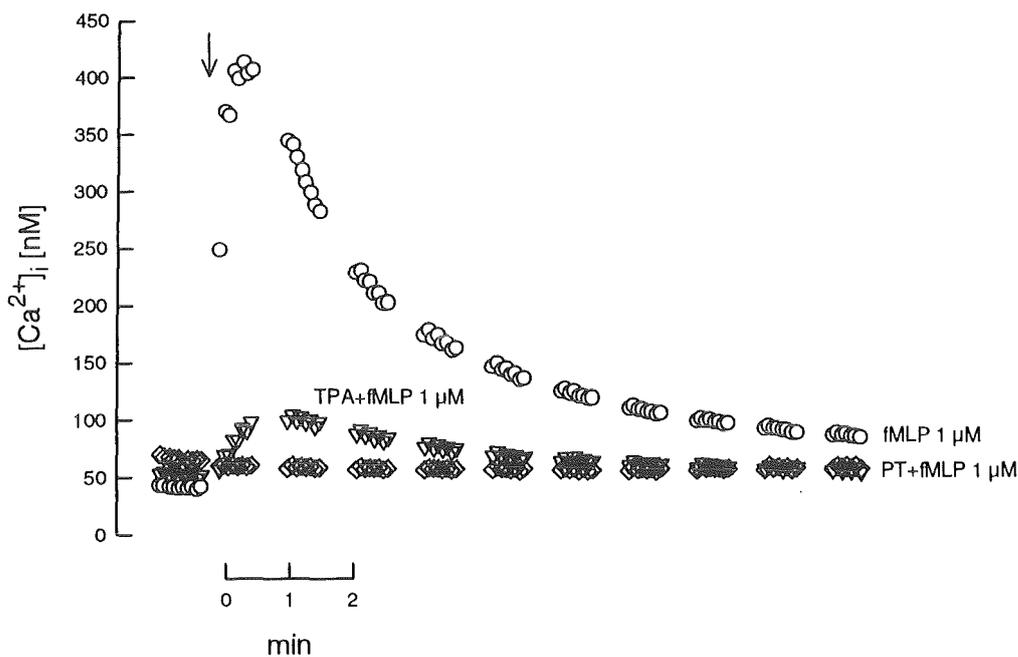


**Abb. 11: Die von Arachidonsäure induzierte Aktivierung von Calciumströmen in HL-60 Zellen.**

Die HL-60 Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen. Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt worden war, wurden die Zellen mit Arachidonsäure (AA), im calciumhaltigen (2 mM  $Ca^{2+}$ ) oder im calciumfreien Medium (5 mM EGTA) stimuliert. Nach den Messungen wurden 3 Replikate zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die dargestellten Ergebnisse stehen stellvertretend für 3 Experimente.

Im calciumfreien Medium konnte die Arachidonsäure keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren, da offensichtlich kein Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisiert wurde. Mit diesen Charakteristika unterscheidet sich Arachidonsäure in ihrer Wirkung deutlich von fMLP.

Die Signaltransduktionsmechanismen, die z.B. von Histamin und Arachidonsäure aktiviert werden, sind potentielle Angriffsorte der Organometalle, die in die Untersuchungen einbezogen werden sollten. Zusätzlich sollte untermauert werden, daß die Organometalle, da sie kein Calcium aus intrazellulären Speichern freisetzen, den Signaltransduktionweg der von Hormonen und Wachstumsfaktoren aktiviert wird, nicht beeinträchtigen. Für diese Untersuchungen sind Substanzen wie Pertussistoxin und TPA geeignet, da sie die Signalweiterleitung von physiologischen Stimuli spezifisch unterbrechen. Zur Validierung des experimentellen Ansatzes wurden zunächst Versuche mit dem Rezeptoragonisten fMLP durchgeführt.



**Abb. 12: Der Effekt von Pertussistoxin und dem Phorbol ester TPA auf die fMLP-induzierte Signaltransduktion.**

Differenzierte HL-60 Zellen wurden mit Fluo-3 beladen und mit fMLP (Pfeil) stimuliert, nachdem die Zellen mit Pertussistoxin (PT, 1,5 µg/ml, 3 h) bzw. mit einem Phorbol ester (TPA, 100 nM, 10 min) behandelt worden waren, oder unbehandelt blieben. Nach den Messungen wurden 3 Replikate zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 3 - 5 Experimente.

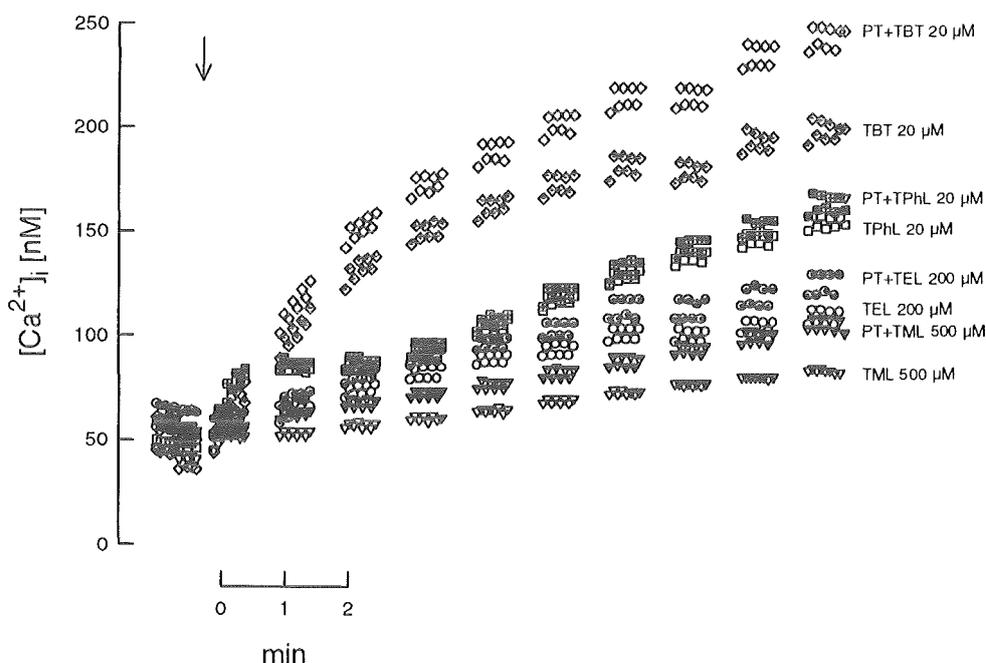
Pertussistoxin, das Gift des Keuchhustenerregers (*Bordetella pertussis*), unterbricht die Signaltransduktion durch ADP-Ribosylierung bestimmter G-Proteine und ist daher ein geeignetes Instrument zur Untersuchung der Beteiligung von rezeptorvermittelten, zellulären Vorgängen. Die Zellen wurden für 3 h mit dem Toxin (1,5 µg/ml) vorinkubiert, wobei nach 2,5 h zusätzlich die

Beladung der Zellen mit Fluo-3 erfolgte. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, verhindert Pertussistoxin den durch fMLP induzierbaren Calciumeinstrom ins Zytosol vollständig, da es die Signalübertragung zwischen dem fMLP-Rezeptor und der PLC unterbricht.

Der Phorbol ester (TPA), der eine dem DAG analoge Struktur besitzt, führt aufgrund seiner hohen metabolischen Resistenz zu einer persistenten Aktivierung der PKC, die wiederum durch Phosphorylierung die PLC inaktiviert. Die Vorinkubation mit TPA (Abb. 12) konnte den transienten Calciumstrom der durch fMLP aktiviert worden war recht deutlich verringern. Beide Substanzen erwiesen sich somit als brauchbare Werkzeuge, um eine mögliche Wirkung der Organometalle auf die rezeptoraktivierte Signaltransduktion zu untersuchen.

### 3.3.2.1. Der Effekt von Pertussistoxin auf den organometall-induzierten Calciuminflux

Während in den Kontrollexperimenten die Vorbehandlung mit Pertussistoxin den rezeptoraktivierten Calciumeinstrom ins Zytosol völlig verhindern konnte (Abb. 12), hatte die Vorinkubation mit Pertussistoxin in keinem Fall einen hemmenden Einfluß auf die durch Organometalle induzierte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Es konnte in einigen Experimenten sogar eine leichte Verstärkung des Effekts beobachtet werden (Abb. 13).



**Abb. 13: Der Effekt von Pertussistoxin auf die von den Organometallen induzierten Calciumströme.**

Differenzierte HL-60 Zellen wurden mit Pertussistoxin (PT; 1,5 µg/ml) für 3 h vorinkubiert und mit Fluo-3 beladen. Anschließend wurden sie mit den Organometallen behandelt und die Fluoreszenz des Calciumindikators für 10 min gemessen. In den Experimenten wurden immer vorbehandelte und unbehandelte Zellen parallel im selben Versuchsansatz untersucht. Die gezeigten Kurven sind die Mittelwerte von 3 Replikaten und stehen stellvertretend für 2-4 Experimente.

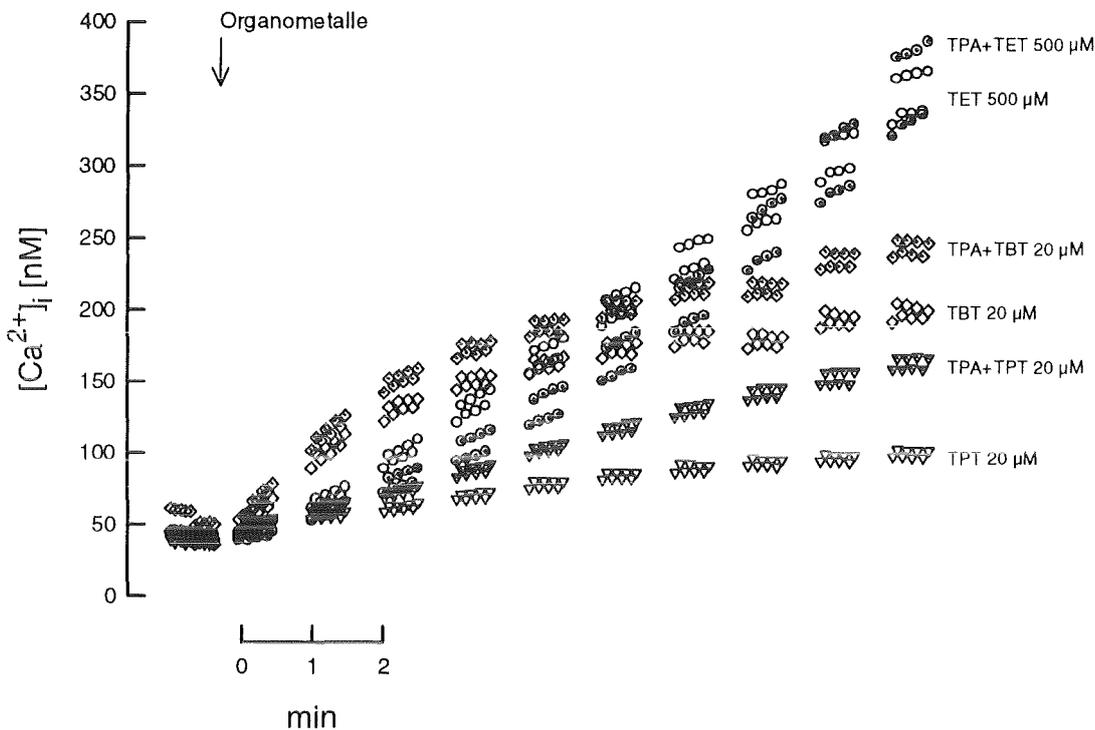
### 3.3.2.2. Der Effekt von 12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat (TPA) auf den organometall-induzierten Calciuminflux

Die Inaktivierung der PLC durch die Vorinkubation mit TPA war in den Kontrollexperimenten mit fMLP deutlich sichtbar (Abb. 12). In Studien mit den Organometallen konnte nach der Vorbehandlung mit TPA keine hemmende Wirkung beobachtet werden, sondern bei fast allen Versuchen war die  $[Ca^{2+}]_i$  nach 10 minütiger Einwirkung der Organometalle höher, als in Zellen, die nicht vorbehandelt waren. Nur in wenigen Ansätzen waren die Calciumkonzentrationen in den vorbehandelten und unbehandelten Zellen nach 10 min gleich hoch (Abb. 14, Tab. 4). TPA selbst hatte während des untersuchten Zeitraums keinen sichtbaren Einfluß auf den Calciumhaushalt der HL-60 Zellen.

**Tab. 4: Der Effekt des Phorbolesters TPA auf die von den Organometallen induzierte Erhöhung der zytosolischen freien Calciumkonzentration.**

Die zytosolische freie Calciumkonzentration wurde in HL-60 Zellen gemessen, nachdem sie für 10 min mit den Xenobiotika behandelt worden waren. In den Versuchen mit TPA erfolgte eine Vorinkubation (100 nM, 10 min). Behandelte und unbehandelte Zellen wurden parallel im selben Versuchsansatz gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichungen (SD) von 3-4 Experimenten. Die Ergebnisse der mit TPA vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Zellen sind statistisch nicht verschieden.

Behandlung		$[Ca^{2+}]_i$
Substanz	Konzentration [ $\mu$ M]	[nM] $\bar{x} \pm SD$
Kontrolle TPA	-	50 $\pm$ 2
TML	500	70 $\pm$ 14
TPA +TML	500	110 $\pm$ 43
TEL	200	100 $\pm$ 19
TPA +TEL	200	143 $\pm$ 38
TPhL	20	153 $\pm$ 51
TPA +TPhL	20	170 $\pm$ 67
TET	500	213 $\pm$ 45
TPA +TET	500	264 $\pm$ 56
TPT	40	98 $\pm$ 11
TPA +TPT	40	136 $\pm$ 43
TBT	20	111 $\pm$ 24
TPA +TBT	20	136 $\pm$ 43



**Abb. 14: Kinetik des organometall-induzierten Calciumeinstroms nach Vorbehandlung der Zellen mit TPA.**

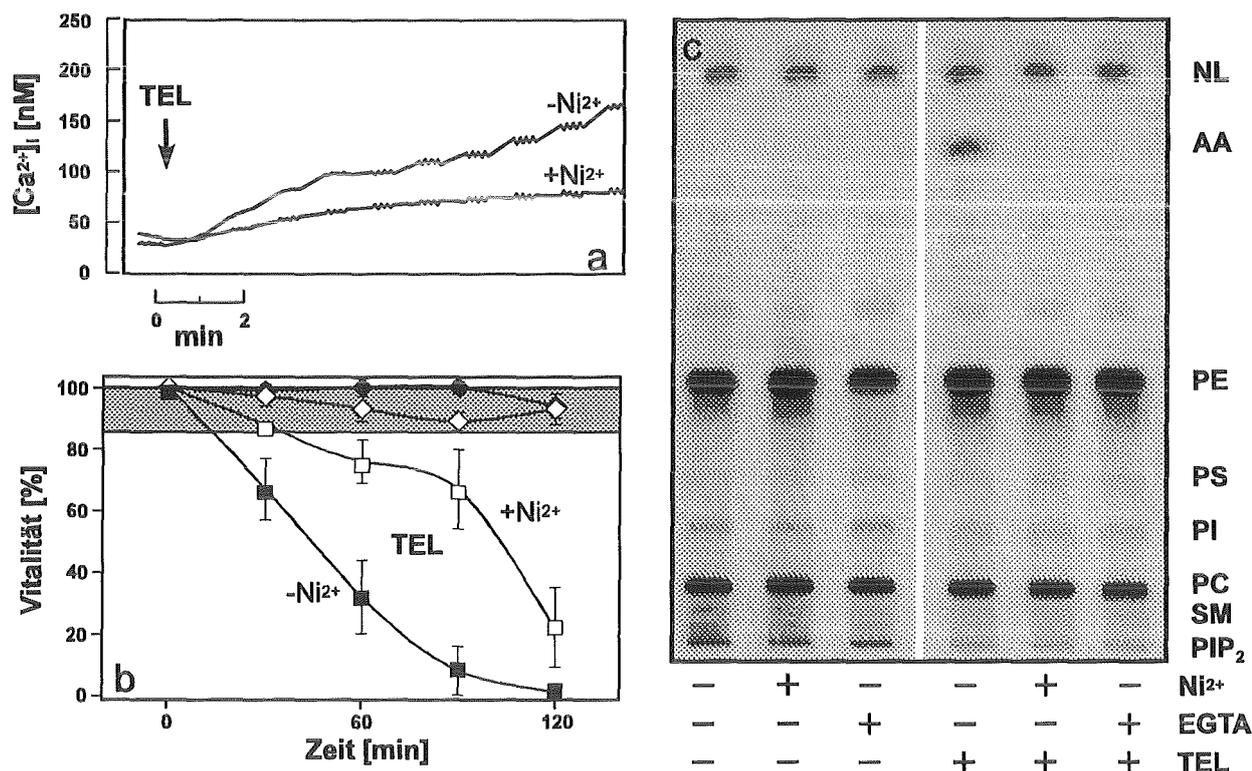
Differenzierte HL-60 Zellen wurden mit Fluo-3 beladen und mit einem Phorbolster (TPA) für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurden sie mit den Organometallen behandelt und die Fluoreszenz des Calciumindikators wurde für 10 min gemessen. Die Kurven zeigen die Mittelwerte aus 3 Replikaten und stehen stellvertretend für die Experimente, die in Tabelle 3 zusammengefaßt sind.

### 3.3.3. Effekte der Organometalle auf die zellulären Ionengradienten

Ionengradienten an der Plasmamembran sind z.B. für das Membranpotential und die Signalweiterleitung in Zellen von besonderer Bedeutung. Die zytosolische freie Calciumkonzentration und Calciumströme sind aber auch von anderen Ionen abhängig. Ionenpumpen oder -austauscher benötigen für ihre Funktion Gegenionen. Deshalb sollte untersucht werden, inwiefern die organometalle-induzierte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit anderen Ionengradienten zusammenhängt und inwieweit auch andere Ionengradienten durch die Organometalle verändert werden.

### 3.3.3.1. Untersuchungen zu Wirkungen auf Calciumkanäle der Plasmamembran

Zur Untersuchung von Calciumkanälen wird Nickel ( $\text{NiCl}_2$ ) vor allem in nicht erregbaren Zellen eingesetzt, da für diese Zellen noch keine spezifischen organischen Hemmstoffe zur Verfügung stehen, die ohne Nebenwirkung auf den Calciumhaushalt bleiben.



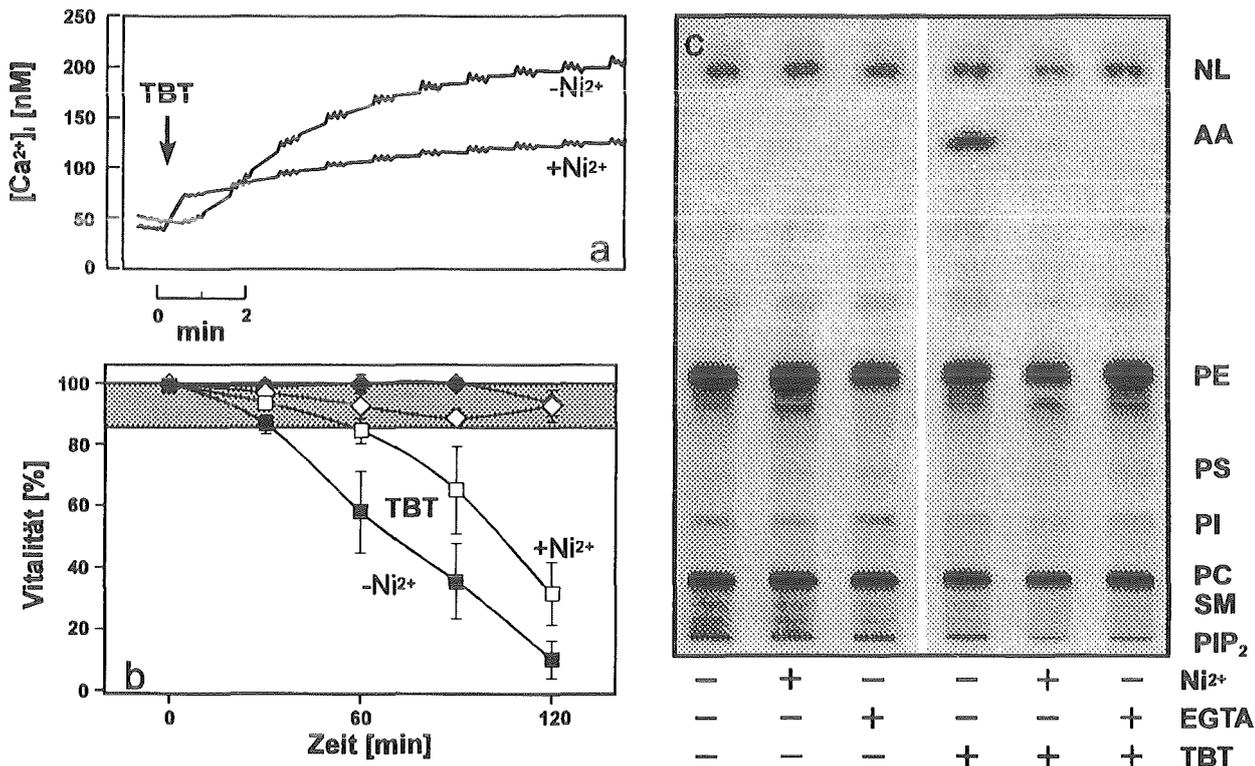
**Abb. 15:** Der Effekt des Calciumkanalblockers  $\text{Ni}^{2+}$  auf die von TEL induzierte Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels, die Bildung von freier Arachidonsäure und die Vitalität von HL-60 Zellen.

Differenzierte HL-60 Zellen wurden mit  $\text{Ni}^{2+}$  (10 mM) bzw. mit EGTA (3 mM) vorinkubiert und dann mit TEL behandelt. Für die Bestimmung der zytosolischen Calciumkonzentration (a) wurden die Zellen mit Fluo-3 beladen und anschließend Wirkung von TEL (200  $\mu\text{M}$ ) auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  für 10 min verfolgt. Die dargestellten Kurven zeigen die Mittelwerte von jeweils 3 Replikaten und stehen stellvertretend für die Experimente, die in Tabelle 5 zusammengefaßt sind.

Der Effekt von TEL (200  $\mu\text{M}$ ) auf die Vitalität (b) der Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem Trypanblau-Test bestimmt. Die Kontrollen waren unbehandelte Zellen ( $\blacklozenge$ ) und mit  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\diamond$ ) behandelte Zellen. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 Experimenten.

Die Arachidonsäurefreisetzung (c) nach TEL-Behandlung von markierten Zellen steht stellvertretend für die Ergebnisse aus Tabelle 9. Bahn 1-3 zeigt die Kontrollen: Lösungsmittel,  $\text{Ni}^{2+}$  und EGTA-Medium. Die Bahnen 4-6 demonstrieren die Wirkung nach TEL (100  $\mu\text{M}$ ) Behandlung: Bahn 4 zeigt TEL alleine, Bahn 5 nach der Vorinkubation mit  $\text{Ni}^{2+}$  und Bahn 6 nach der Behandlung im calciumfreiem Medium. Verwendete Abkürzungen: Arachidonsäure (AA), Neutrallipide (NL), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), Sphingomyelin (SM). Die Untersuchungen zur Arachidonsäurefreisetzung in calciumfreiem Medium wurden von A. Käfer durchgeführt und wurden bereits publiziert (Käfer & Krug, 1994).

Um eine Blockade von Calciumkanälen zu erreichen, muß  $\text{Ni}^{2+}$  in Konzentrationen von 5-10 mM eingesetzt werden (Demaurex *et al.*, 1992; Zweifach & Lewis, 1993). Wie durch die Experimente mit dem chemotaktischen Peptid fMLP gezeigt werden konnte ist  $\text{Ni}^{2+}$  ein brauchbarer Inhibitor von Calciumkanälen. Der Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum wurde durch  $\text{Ni}^{2+}$  fast vollständig verhindert (Abb. 5).



**Abb. 16:** Der Effekt des Calciumkanalblockers  $\text{Ni}^{2+}$  auf die von TBT induzierte Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels, die Vitalität und die Bildung von freier Arachidonsäure von HL-60 Zellen.

Differenzierte HL-60 Zellen wurden mit  $\text{Ni}^{2+}$  (10 mM) bzw. mit EGTA (3 mM) vorinkubiert und dann mit TBT behandelt. Die Wirkung von TBT (20  $\mu\text{M}$ ) auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde für 10 min aufgezeichnet (a).

Der Effekt von TBT (20  $\mu\text{M}$ ) auf die Vitalität (b) der Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem Trypanblau-Test bestimmt. Die Kontrollen waren unbehandelte Zellen ( $\blacklozenge$ ) und mit  $\text{Ni}^{2+}$  ( $\diamond$ ) behandelte Zellen.

Die Arachidonsäurefreisetzung nach der Behandlung mit TBT (10  $\mu\text{M}$ ) ist dem Teil c der Abbildung zu entnehmen. Weitere Einzelheiten sind der Legende von Abbildung 15 zu entnehmen. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit F. Zaucke durchgeführt.

Im Gegensatz dazu verminderte der Calciumkanalblocker die Wirkung der Organometalle nur zum Teil oder er blieb, wie in den Versuchen mit TPT und TET wirkungslos (Tab. 5). Die Hemmung des Effekts durch  $\text{Ni}^{2+}$  war im Fall von TPhL 53 %, bei TEL 54 %, bei TML 44 % und im Fall von TBT 56 %. Allgemein ist noch hinzuzufügen, daß  $\text{Ni}^{2+}$  in unstimulierten bzw. unbehandelten Zellen zu keiner Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  führte. Die Abbildungen 15 a + 16 a

zeigen die Kinetik des durch TBT und TEL induzierten Calciumeinstroms in das Zytosol, nach der Vorinkubation mit oder ohne  $\text{Ni}^{2+}$ . Aus diesen Abbildungen wird deutlich, daß der Calciumkanalblocker im Fall von TEL sofort nach der Zugabe des Organometalls den Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verminderte, während beim TBT die Wirkung von  $\text{Ni}^{2+}$  erst nach der zweiten Minute zum Tragen kam. Die Vorbehandlung mit  $\text{Ni}^{2+}$  verzögerte auch das Absterben der Zellen während einer Inkubation mit TEL und TBT deutlich (Abb. 15 b + 16 b). Auch die von den beiden Substanzen ausgelöste Arachidonsäurefreisetzung, die von der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  abhängig ist, wurde durch die Vorbehandlung mit  $\text{Ni}^{2+}$ , genauso wie im calciumfreien Medium (3 mM EGTA) gehemmt.

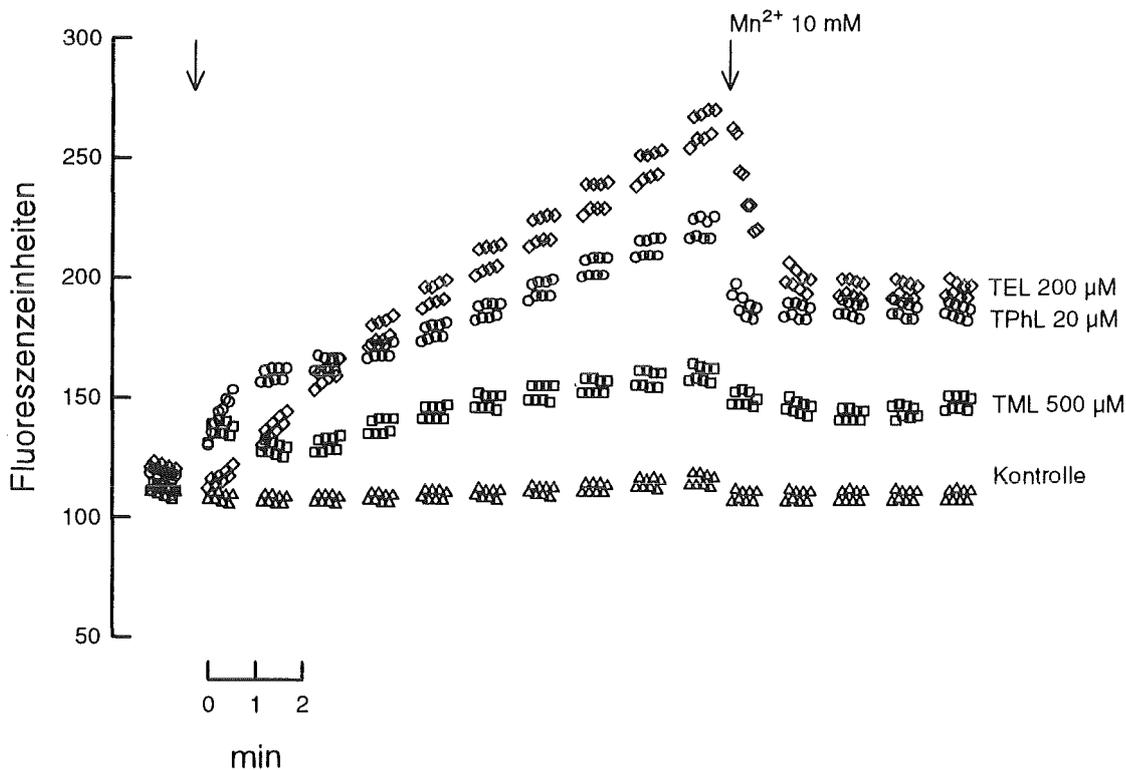
**Tab. 5: Die Wirkung des Calciumkanalblockers Nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) auf den organometall-induzierten Calciumeinstrom ins Zytosol.**

Die zytosolische Calciumkonzentration der mit den Organometallen behandelten HL-60 Zellen wurde mit oder ohne vorherige Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  (10 mM) parallel in einer Mikrowellplatte gemessen. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichungen (SD) von 4-6 Experimenten. Nach jedem Experiment wurden die Meßwerte von jeweils drei Replikaten zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Effekte wurden im Vergleich zu den Kontrollen auf Signifikanz getestet. Die signifikanten Werte wurden gekennzeichnet:  $p < 0,025$  (\*) bzw.  $p < 0,01$  (\*\*).

Behandlung		$[\text{Ca}^{2+}]_i$
Substanz	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	[nM] $\bar{x} \pm \text{SD}$
Kontrolle $\text{Ni}^{2+}$	-	42 $\pm$ 11
$\text{Ni}^{2+}$ +TML	500	68* $\pm$ 11
TML	500	88 $\pm$ 19
$\text{Ni}^{2+}$ +TEL	200	98** $\pm$ 18
TEL	200	163 $\pm$ 22
$\text{Ni}^{2+}$ +TPhL	20	89** $\pm$ 11
TPhL	20	143 $\pm$ 30
$\text{Ni}^{2+}$ +TET	500	170 $\pm$ 26
TET	500	169 $\pm$ 49
$\text{Ni}^{2+}$ +TPT	40	131 $\pm$ 44
TPT	40	132 $\pm$ 27
$\text{Ni}^{2+}$ +TBT	20	103** $\pm$ 14
TBT	20	181 $\pm$ 19

Auch mit Hilfe von Mangan ( $\text{MnCl}_2$ ) ist es möglich zu untersuchen, wie Calcium aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol von HL-60 Zellen einströmt.  $\text{Mn}^{2+}$  löscht die Fluoreszenz von Fluo-3, wenn es anstelle von Calcium gebunden wird (Kao *et al.*, 1989; Merritt *et al.*, 1990).

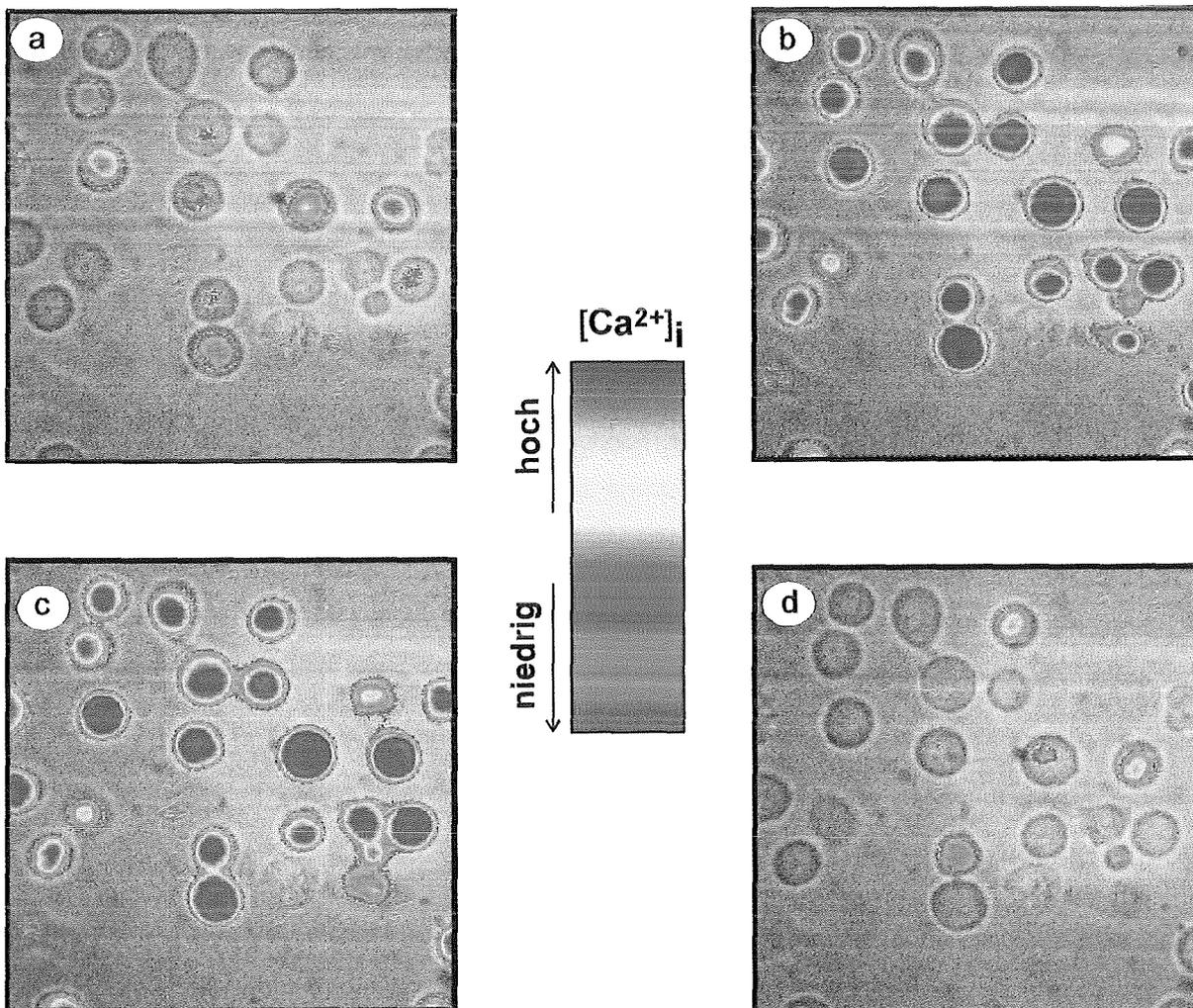
Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde nachgewiesen, daß  $Mn^{2+}$  durch spezifische Kanäle ins Zytosol von HL-60 Zellen strömt. Zum einen wurden Versuche mit verschiedenen Pharmaka durchgeführt die den Calciumeinstrom durch die Membran aktivieren, nachdem sie die Entleerung von intrazellulären Calciumspeichern bewirkt haben (Kapazitatives Modell, vgl. Einleitung). Zum anderen handelt es sich um Rezeptoragonisten, die einen Calciumeinstrom induzieren. Mit diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß  $Mn^{2+}$  auf demselben Weg wie  $Ca^{2+}$  ins Zytosol der HL-60 Zellen gelangt (Demaurex *et al.*, 1992; Krautwurst *et al.*, 1992; Montero *et al.*, 1994). Die Effekte von Mangan im Anschluß an eine Organometallbehandlung sind den Abbildungen 17 + 18 zu entnehmen. Nach der Behandlung mit den Bleiverbindungen und mit TBT war es durch Zugabe von  $Mn^{2+}$  möglich, die Fluoreszenz von Fluo-3 teilweise zu löschen. Die Fluoreszenz sank sehr schnell ab, ein Effekt der nur darauf zurückzuführen ist, daß  $Mn^{2+}$  in die Zellen strömt, anstelle von  $Ca^{2+}$  an Fluo-3 bindet und dessen Fluoreszenz löscht.



**Abb. 17: Der Effekt von Mangan ( $Mn^{2+}$ ) auf die von den Organometallen induzierte Fluoreszenz von Fluo-3 im Zytosol von HL-60 Granulozyten.**

HL-60 Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen und zum angegebenen Zeitpunkt mit den Bleiverbindungen behandelt (Pfeil). Im Anschluß an die 10 minütige Inkubation mit den Organometallen wurde  $Mn^{2+}$  (10 mM) zupipettiert und die Fluoreszenz für weitere 5 min aufgezeichnet. Die dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte von jeweils 3 Replikaten und stehen stellvertretend für 5 Experimente.

In Experimenten mit HL-60 Zellen, die mit TPT und TET behandelt worden waren, konnte kein Effekt von  $Mn^{2+}$  auf die Fluoreszenz des Calciumindikators Fluo-3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse korrelieren mit den Untersuchungen, in denen  $Ni^{2+}$  als Calciumkanalblocker eingesetzt wurde. TET und TPT bewirken demnach keinen Einstrom von Calcium durch Kanäle in der Plasmamembran. Sie unterscheiden sich daher eindeutig von den anderen untersuchten Substanzen.



**Abb. 18: Der Effekt von Mangan auf die Fluoreszenz von HL-60 Zellen nach der Behandlung mit TBT.**

Die Abbildung zeigt Videoaufnahmen von HL-60 Zellen, die mit Fluo-3 beladen waren. Das Durchlichtbild wurde mit einem Ölimmersionsobjektiv (100/1,3) aufgenommen und zeigt die Zellen vor der Behandlung mit TBT in 100facher Vergrößerung. Das Durchlichtbild wurde mit den Fluoreszenzwerten, die von der Kamera vor und nach der Behandlung mit TBT ( $20 \mu M$ ) detektiert worden waren, überlagert. Die aufgezeichneten Grauwerte wurden in Farben konvertiert. Die Fluoreszenz ist vor der Behandlung (a), sowie nach 5 min (b) und 10 min (c) gezeigt. Die Aufnahme (d) stellt die Fluoreszenz 1 min nach der Zugabe von  $Mn^{2+}$  (10 mM) dar.

### 3.3.3.2. Der Effekt der Organometalle auf die $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen.

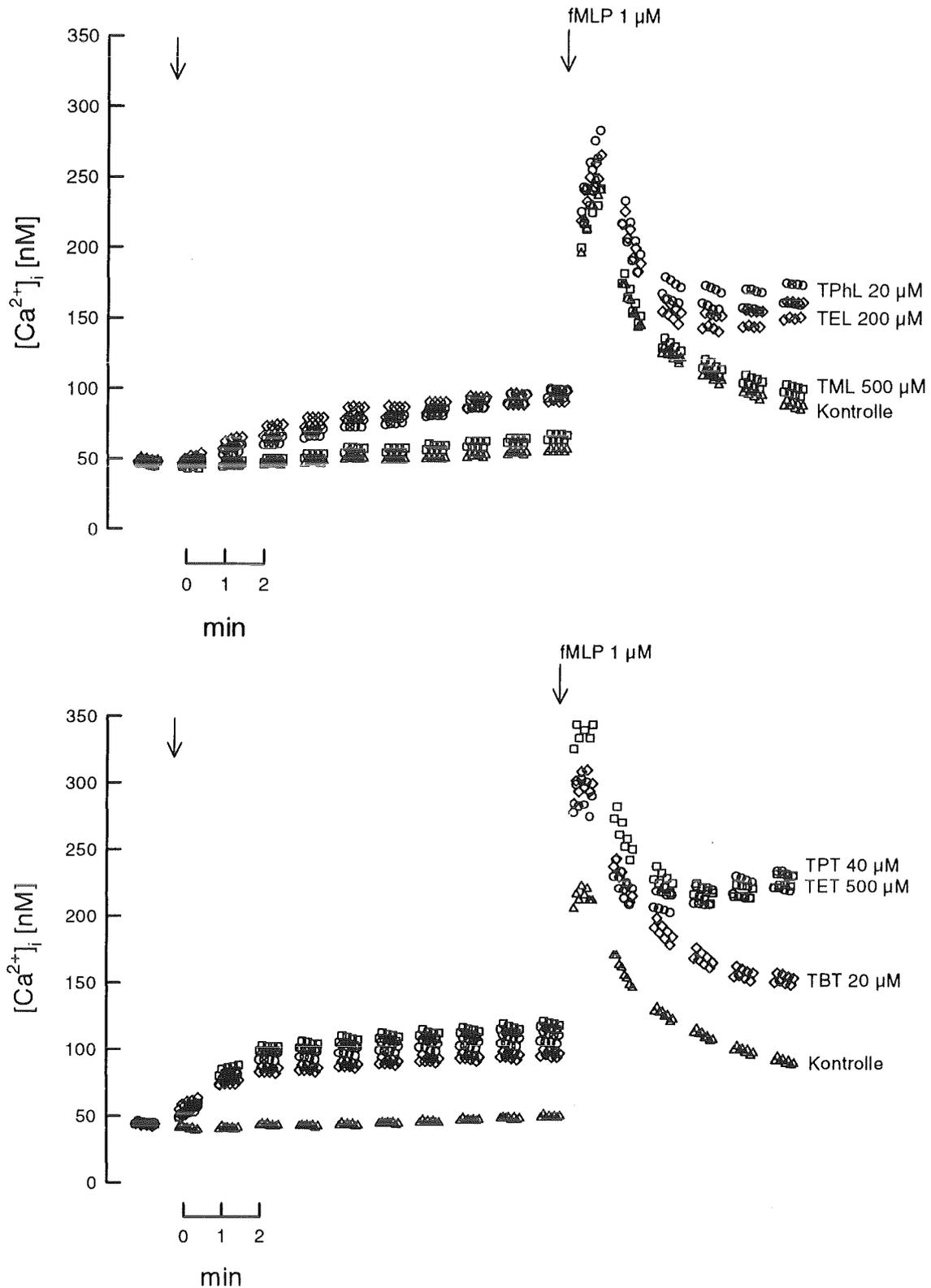
Da schon geringe Veränderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  physiologische Wirkungen haben können, muß sie sehr genau reguliert werden. Dazu besitzen Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Diese Transporter, die unter anderem auch in der Plasmamembran lokalisiert sind, leisten einen wichtigen Beitrag zur Regulation der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Im Gegensatz zu den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern, besitzt die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase eine hohe Affinität, aber eine geringere Transportkapazität für Calcium. Eine Beeinträchtigung der Funktion der ATPase, wie z.B. ein ATP-Mangel, würde sich daher vor allem in niedrigen Konzentrationbereichen von Calcium bemerkbar machen.

Es war von Interesse, ob die Organometalle die ATPasen hemmen. Da für die direkte Untersuchung der ATPasen derzeit keine Inhibitoren zur Verfügung stehen, waren Experimente durchzuführen, die indirekt die Wirkung der Organometalle auf die ATPasen zeigen sollten. Im calciumfreien Medium konnte durch die Applikation von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor eine Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen nachgewiesen werden (Abb. 9 + 10). Durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor wurde ein Calciumeinstrom ins Zytosol ausgelöst, der in unbehandelten und in mit Organometallen behandelten Zellen gleich groß war (wie schon besprochen wurde, werden die intrazellulären Calciumspeicher durch die Organometalle nicht entleert). Im weiteren Verlauf der Versuche zeigten sich aber Unterschiede im Fluoreszenzverlauf der Kontrollen im Vergleich zu den behandelten Zellen. Während in den Kontrollen die Fluoreszenz nach der Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor schnell auf den ursprünglichen Wert absank, war dies in den Zellen, die mit den Organometallen behandelt waren, nicht der Fall. Die Abweichungen beim Rückgang der Fluoreszenz wurden im Fall von TET und TPT besonders deutlich (Abb. 9 b). Das Absinken der Fluoreszenz nach der Applikation von Thapsigargin und nach der Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor resultiert möglicherweise aus der Aktivität von calciumtransportierenden Proteinen oder daher, daß Calcium aus den Zellen in den extrazellulären Raum diffundiert. Die Proteine, um die es sich handelt, sind die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu differenzieren, wurden die Zellen vor der Messung auf 4 °C abgekühlt bzw. mit Amilorid vorinkubiert und anschließend mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor behandelt (Abb. 10 b). Amilorid hemmt, wenn es in hohen Konzentrationen eingesetzt wird, den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Mit Hilfe der Vorkühlung sollte gezeigt werden, daß es sich beim Rückgang der Fluoreszenz nicht um eine

Diffusion von Calcium handelt. Wie in Abbildung 10 b zu sehen ist, hatte Amilorid keinen Einfluß auf das Absinken der von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor induzierten Fluoreszenz, während die Kühlung der Zellen bis zum Versuchsbeginn (das Fluoreszenzspektrometer ist nicht kühlbar) zunächst das Abklingen der Fluoreszenz deutlich verminderte. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen das Calcium in den extrazellulären Raum transportieren und damit für das Absinken der Fluoreszenz nach der Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor verantwortlich sind.

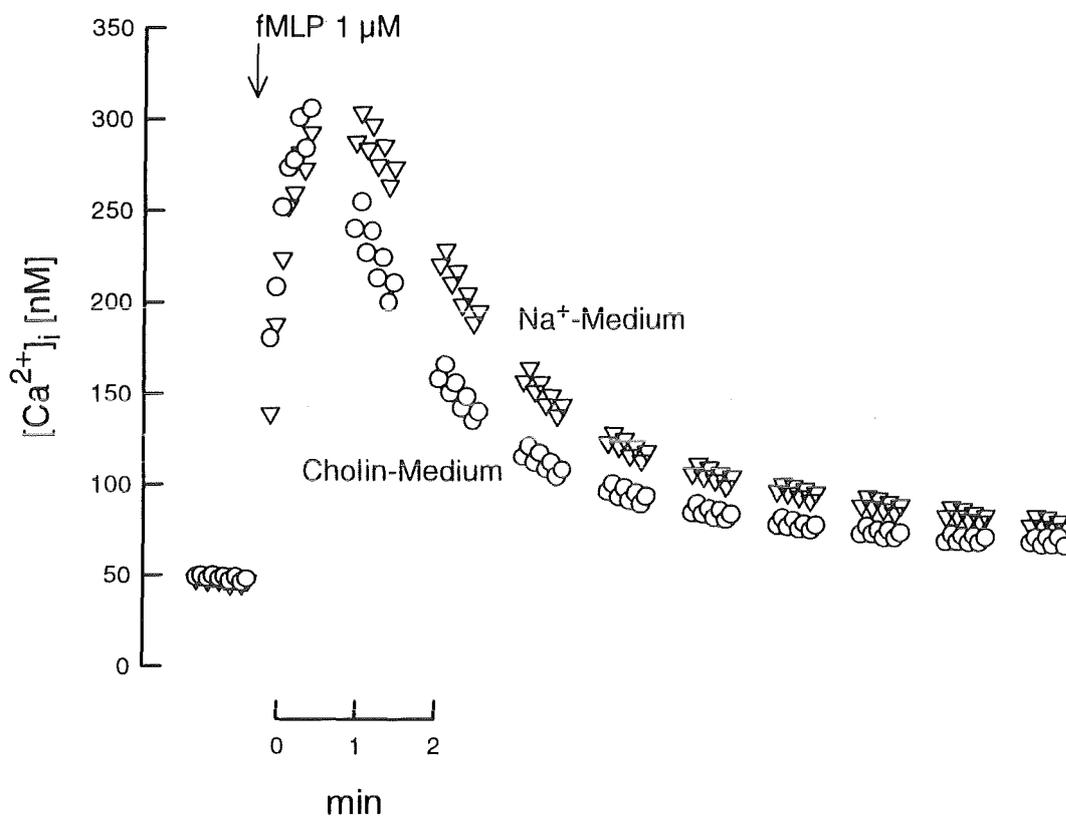
Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Versuche ist der Energiehaushalt der Zellen. Schon mehrfach wurde berichtet, daß Organometalle die Bildung von ATP in den Mitochondrien beeinträchtigen und dadurch ein Energiedefizit verursachen können (Selwyn, 1976, Chow *et al.*, 1992). Die Calciumspeicherung im ER ist von energieverbrauchenden  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen abhängig, da Calcium ständig aus dem ER ins Zytosol diffundiert. Daher bewirkte die Hemmung der ATPase durch Thapsigargin einen raschen Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Abb. 10). Die Organometalle verursachten diesen Effekt nicht (Abb. 9 + 10). Folglich gab es im Untersuchungszeitraum kein Energiedefizit, dessen Umfang zu einem verminderten Transport von Calcium durch die ATPasen geführt hätte und als dessen Folge die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ansteigen wäre.

Da in diesen Experimenten kein Calciumgradient an der Plasmamembran vorhanden war, dessen Aufrechterhaltung ebenfalls Energie erfordert, sollten nach Möglichkeit auch Experimente in calciumhaltigen Medium durchgeführt werden. Für diese Experimente schien das chemotaktische Peptid fMLP geeignet. Denn die Verwendung von natriumfreiem Medium hatte ergeben, daß die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die Regulation des durch fMLP induzierten transienten Calciuminfluxes nicht beeinflussen (Abb. 20), sondern, daß alleine die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen das Calcium aus den Zellen in den extrazellulären Raum transportieren. Daher wurden die Zellen, nach Organometallenbehandlung, mit fMLP stimuliert. Dem schnellen fMLP-induzierten Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  konnten die behandelten Zellen, zunächst wie die unbehandelten Kontrollen, gegenregulieren (Abb. 19). Erst nach einigen Minuten traten besonders im Falle von TET und TPT Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf. Das niedrige Niveau der Kontrollen wurde im Untersuchungszeitraum in organometall-behandelten Zellen in keinem Fall mehr erreicht.



**Abb. 19: Der Effekt von fMLP auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen im Anschluß an eine Behandlung mit Organometallen.**

Die HL-60 Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen. Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt worden war, wurden die Zellen zunächst für 10 min mit den Organometallen und anschließend mit fMLP behandelt. Nach den Messungen wurden jeweils 3 Replikate zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 4 Experimente.



**Abb. 20: Der Effekt von natriumfreiem Medium (Cholin-Medium) auf die von fMLP induzierte Calciumkinetik von HL-60 Zellen.**

HL-60 Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen und im natriumhaltigen oder im natriumfreien Medium inkubiert. Zunächst wurde die Fluoreszenz im unstimulierten Zustand bestimmt und dann wurde fMLP appliziert (Pfeil). Die Kinetik wurde für 10 min gemessen. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte aus jeweils 3 Replikaten und stehen stellvertretend für 3 Experimente.

### 3.3.3.3. Untersuchungen zum Effekt der Organometalle auf den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher der Plasmamembran

Die Untersuchungen mit natriumfreiem Medium wurden durchgeführt, um die mögliche Beeinträchtigung des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers durch die Organometalle zu überprüfen. Der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher ist wie die Ca<sup>2+</sup>-ATPase in vielen Zellen wichtig für die Regulation des zytosolischen Calciumspiegels. Die Verwendung eines natriumfreien Mediums schien zur Untersuchung der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher geeignet, denn die Verfügbarkeit von Natrium ist für die Funktion des Austauschers essentiell. Da dieses Medium völlig anders zusammengesetzt war, als das routinemäßig verwendete Inkubationsmedium, wurde eine Systemkontrolle mit einem

Kontrollmedium durchgeführt (siehe Kap. 2.3.), um einen Einfluß der Medienzusammensetzung auf den Organometalleffekt auszuschließen. Die Substitution von Natriumchlorid durch Cholinchlorid resultierte in einigen Fällen in einer deutlich verstärkten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Organometalle (Tab. 6). In Zellen, die mit TEL, TML und TBT behandelt wurden, stieg die  $[Ca^{2+}]_i$  in natriumfreiem Medium im Vergleich zum natriumhaltigen Medium stärker an.

**Tab. 6: Der Effekt der Organometalle auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen im natriumfreien und natriumhaltigen Medium.**

Die Wirkung der Organometalle auf den Calciumhaushalt von HL-60 Zellen wurde in natriumfreiem Medium (140 mM Cholinchlorid) und in Medium mit Natrium (140 mM) untersucht. Differenzierte HL-60 Zellen, die mit Fluo-3 beladen waren, wurden mit den Xenobiotika behandelt. Die calciumabhängige Fluoreszenz wurde gemessen und nach 10 min die zytosolische Calciumkonzentration berechnet. Jeweils drei parallele Ansätze wurden zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Behandlung mit einem Organometall erfolgte im selben Versuchsansatz in natriumfreiem Medium bzw. in natriumhaltigem Kontrollmedium. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) aus 2 - 7 Experimenten. Die Wirkung der Organometalle auf Zellen, die im natriumhaltigen Medium inkubiert waren, wurde im Vergleich zu Zellen im natriumfreien Kontrollmedium auf Signifikanz getestet. Die signifikanten Werte sind gekennzeichnet:  $p < 0,05$  (\*) bzw.  $p < 0,025$  (\*\*).

Behandlung		$[Ca^{2+}]_i$ [nM]
Substanz	Konzentration [ $\mu$ M]	
		$\bar{x} \pm SD$
Na <sup>+</sup> -frei Kontrolle	-	55
Na <sup>+</sup> Kontrolle	-	53
Na <sup>+</sup> -frei+TML	500	115** $\pm$ 29
TML	500	70 $\pm$ 10
Na <sup>+</sup> -frei+TEL	200	160** $\pm$ 53
TEL	200	98 $\pm$ 39
Na <sup>+</sup> -frei+TPhL	20	103** $\pm$ 7
TPhL	20	93 $\pm$ 8
Na <sup>+</sup> -frei+TET	500	130 $\pm$ 22
TET	500	111 $\pm$ 15
Na <sup>+</sup> -frei+TPT	40	126 $\pm$ 26
TPT	40	118 $\pm$ 29
Na <sup>+</sup> -frei+TBT	20	173* $\pm$ 50
TBT	20	130 $\pm$ 41

Zellen, die mit TPhL behandelt wurden, wiesen nur geringe Unterschiede, Zellen, die mit TPT und TET behandelt wurden, wiesen keine Unterschiede zwischen der Behandlung in den beiden Medien auf.

### 3.3.3.4. Untersuchungen im chloridfreien Medium

Den Organometallen wird die Eigenschaft zugeschrieben Chloridionen im Austausch gegen Hydroxidationen durch Membranen zu transportieren. Es sollte daher untersucht werden, ob sich diese Eigenschaft der Xenobiotika auch auf die  $[Ca^{2+}]_i$  der Zellen auswirkt. Für diese Untersuchungen wurde ein Medium hergestellt, in dem die Chloridionen durch Gluconsäure substituiert worden waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tab. 7: Der Effekt der Organometalle auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen im chloridfreien Medium.**

Die Wirkung der Organometalle auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen wurde im chloridfreien Medium (140 mM Gluconsäure) und in Medium mit  $Cl^-$  (140 mM NaCl) untersucht. Nach 10 min wurde die zytosolische Calciumkonzentration berechnet. Jeweils 3 parallele Ansätze wurden zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Behandlung mit den Organometallen erfolgte parallel im selben Versuchsansatz im chloridfreien bzw. im chloridhaltigen Kontrollmedium. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) von 2-6 Experimenten. Die Wirkung der Organometalle im chloridhaltigen wurde im Vergleich zum chloridfreien Medium auf Signifikanz getestet. Die signifikanten Werte sind gekennzeichnet:  $p < 0,01$  (\*).

Behandlung		$[Ca^{2+}]_i$ [nM]
Substanz	Konzentration [ $\mu$ M]	
Kontrolle $Cl^-$ -frei	-	54
TML	500	138* $\pm$ 53
$Cl^-$ -frei+TML	500	53 $\pm$ 4
TEL	200	125* $\pm$ 38
$Cl^-$ -frei+TEL	200	63 $\pm$ 11
TPhL	20	150 $\pm$ 18
$Cl^-$ -frei+TPhL	20	136 $\pm$ 30
TET	500	143* $\pm$ 12
$Cl^-$ -frei+TET	500	107 $\pm$ 9
TPT	40	145* $\pm$ 15
$Cl^-$ -frei+TPT	40	110 $\pm$ 12
TBT	20	163* $\pm$ 26
$Cl^-$ -frei+TBT	20	120 $\pm$ 26

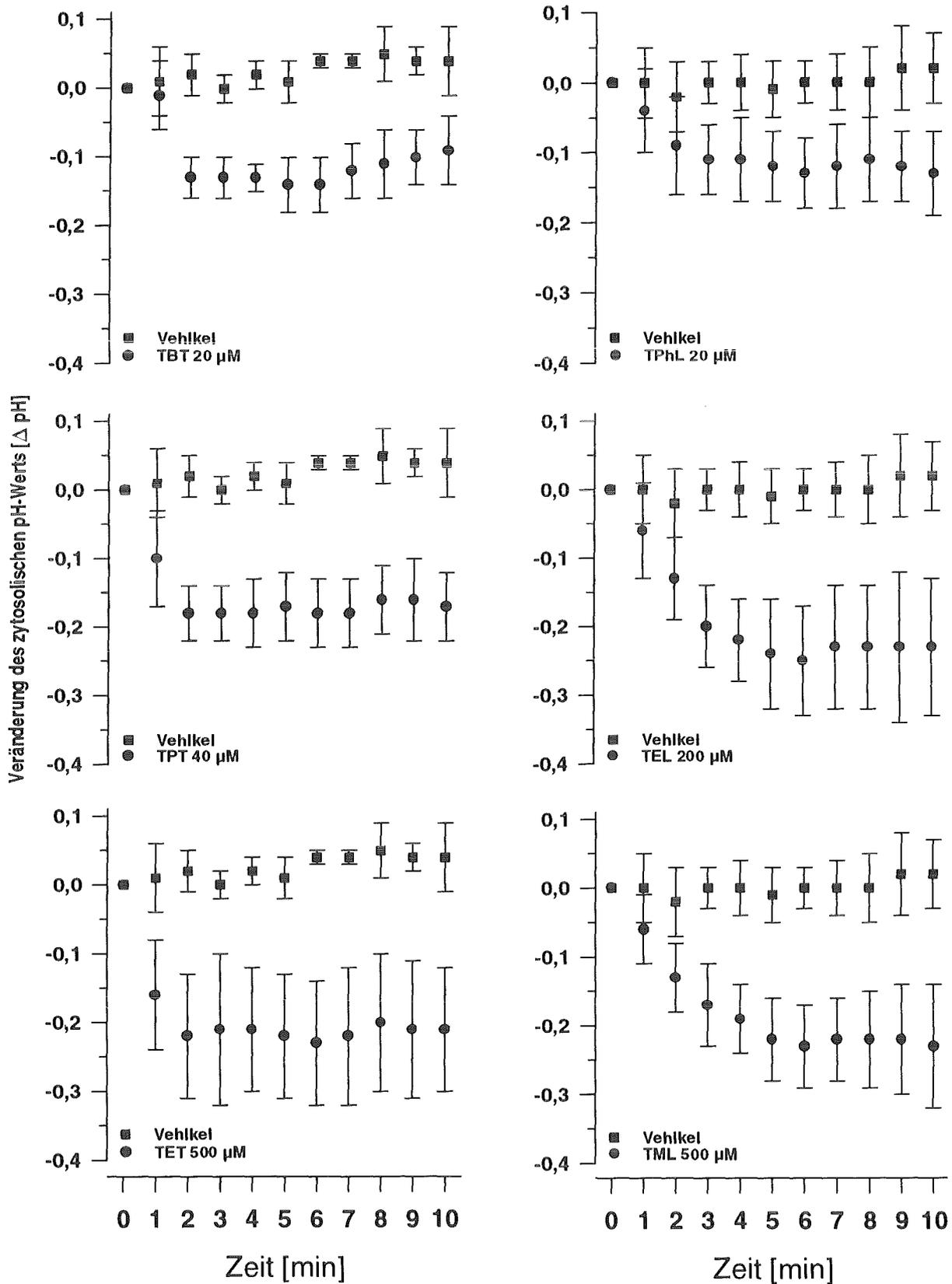
In chloridfreiem Medium verändert sich die Wirkung der Organometalle am deutlichsten nach der Behandlung mit TML und TEL. Der Effekt dieser Substanzen war in chloridfreiem Medium völlig aufgehoben (Kontrollen vgl. Tab. 2). Die Wirkung von TBT ging um 40 %, die von TPT um 39 % und von TET um 41 % zurück. Beim TPhL war ebenfalls eine Abschwächung des Effekts festzustellen, die jedoch nicht signifikant war.

### 3.3.3.5. Der Effekt der Organometalle auf den intrazellulären pH-Wert

Im Zytosol und in der Plasmamembran gibt es zahlreiche Proteine bzw. Lipide, um deren Bindungsstellen Calcium und Protonen konkurrieren. Eine Veränderung des pH-Werts kann daher eine Veränderung der Pufferkapazität für Calcium und damit eine Erhöhung oder Erniedrigung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach sich ziehen. Veränderungen der Calciumkonzentration im Zytosol nach einer Ansäuerung wurden in der Literatur bereits beschrieben (Naccache *et al.*, 1988; Burns *et al.*, 1991). In diesem Zusammenhang werden pH-sensitive Calciumkanäle diskutiert (Tsunoda, 1993). Die Organometalle transportieren Hydroxidionen im Austausch gegen Chloridionen durch Membranen und induzieren dadurch eventuell Veränderungen des zytosolischen pH-Wertes. Da ein Zusammenhang zwischen pH-Wert und  $[Ca^{2+}]_i$  besteht, war es von Interesse, den Einfluß der Organometalle auf den pH-Wert zu untersuchen, wobei auf die besondere Rolle der Chloridionen das Hauptaugenmerk gelegt werden sollte. Zu diesem Zweck wurde die pH-Wert Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF im Labor etabliert. In diesen Versuchen wurden nur die Konzentrationen der Organometalle verwendet, die eine effektive Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentrationen bewirkten.

Durch die Versuchsreihen wurde der Effekt der Organometalle auf den zytosolischen pH-Wert deutlich. Alle untersuchten Verbindungen bewirkten eine Ansäuerung des Zytosols (Abb. 21). Der pH-Wert sank innerhalb von kurzer Zeit ab und pendelte sich, je nach applizierter Metallverbindung, auf ein unterschiedliches Niveau ein. Die stärkste Ansäuerung wurde durch Substanzen mit den kürzeren Alkylketten (TML, TEL, TET), die in hohen Konzentrationen eingesetzt wurden, hervorgerufen. In den Kontrollversuchen mit den Lösungsmitteln (Ethanol und  $H_2O$ ) konnte keine Veränderung des pH-Wertes festgestellt werden.

Wie schon angesprochen, sollen die Organometalle als Ionentransporter wirken können. Diese Hypothese sollte in diesem Zusammenhang für HL-60 Zellen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen im chloridfreien Medium, das auch schon in den Untersuchungen der Wirkung auf die  $[Ca^{2+}]_i$  Verwendung fand, mit den Organometallen behandelt.



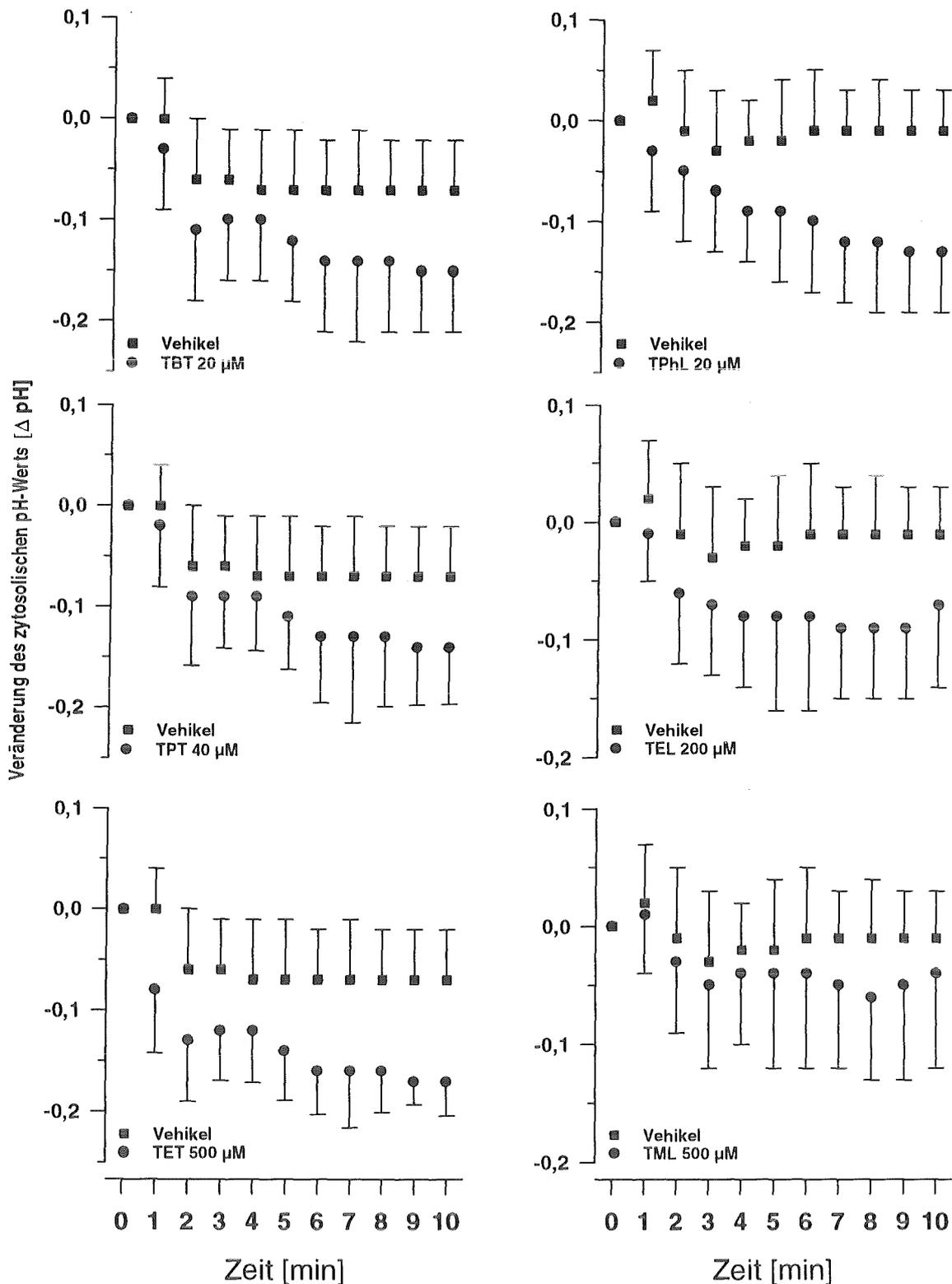
**Abb. 21: Die Veränderung des zytosolischen pH-Wertes nach der Behandlung mit Organometallen.**

Die HL-60 Zellen wurden mit dem pH-Indikator BCECF beladen. Anschließend wurde die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt und die Zellen mit den Organometallen bzw. ihren Lösungsmitteln (Vehikel) behandelt. Die Fluoreszenzemission wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Anregung mit Licht von 430 und 505 nm Wellenlänge gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve aus dem Verhältnis der Emissionen nach Anregung mit den beiden Wellenlängen. Jeweils 3 Replikate wurden zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 7-12 Experimenten. Im allgemeinen ist das Signifikanzniveau nach der zweiten min  $p < 0,01$  mit Ausnahme des 3 min Wertes im Falle von TET ( $p < 0,025$ ) und im Fall von TPhL (nach 2 min  $p < 0,025$ ).

Auch in diesem Medium induzierten alle Organometalle mit Ausnahme von TML eine Absenkung des intrazellulären pH-Werts. Die Ansäuerung trat aber im Vergleich zum chloridhaltigen Medium nicht so schnell ein, da die Veränderungen gegenüber den Kontrollen erst nach einigen Minuten statistisch signifikant waren (Abb. 22). Weiterhin ist noch festzustellen, daß in den Kontrollversuchen mit den Lösungsmitteln allein keine Auswirkung auf den intrazellulären pH-Wertes auftrat.

Der Vergleich der Wirkung der Organometalle in chloridhaltigem mit der Wirkung in chloridfreiem Medium (Tab. 8) ergibt im Falle von TET und TPT zeitweise einen signifikanten Unterschied. Die Ansäuerung, trat wie schon erwähnt, in chloridfreiem Medium nicht so schnell auf, deshalb waren zunächst signifikante Unterschiede zwischen den Effekten in den unterschiedlichen Medien festzustellen. Nach einigen Minuten waren die Effekte der Organometalle in den beiden Medien aber nicht mehr zu unterscheiden. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit TEL und TML sind deutlich verschieden von denen der anderen Organometallen. In chloridfreiem Medium war die Ansäuerung, die durch TEL bewirkt wurde, deutlich verringert und durch die Behandlung mit TML konnte in diesem Medium keine Ansäuerung im Zytosol induziert werden. Die Unterschiede zum chloridhaltigen Medium sind signifikant. Der Effekt von TBT und TPhL war in beiden Medien gleich. Im chloridfreien Medium fiel der pH-Wert genauso wie in chloridhaltigem Medium, die Ansäuerung scheint also bei diesen Verbindungen unabhängig von den Chloridionen zu erfolgen.

Die Wirkungen der alkylierten Bleiverbindungen in chloridfreiem Medium unterschieden sich somit eindeutig von den untersuchten Zinnverbindungen. Deutliche Unterschiede zwischen den Blei- und Zinnverbindungen zeigten sich auch in den Untersuchungen zu ihren Effekten auf die Calciumhomöostase (Tab. 7) und auf die Arachidonsäurefreisetzung (Tab. 9) im chloridfreien Medium.



**Abb. 22:** Die Veränderung des zytosolischen pH-Wertes nach der Behandlung mit Organometallen im chloridfreien Medium.

Die HL-60 Zellen wurden mit dem pH-Indikator BCECF beladen. Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt worden war, wurden die Zellen mit den Organometallen bzw. ihren Lösungsmitteln (Vehikel) im chloridfreien Medium behandelt. Nach den Messungen wurden 3 Replikate zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Experimenten. Im allgemeinen ist das Signifikanzniveau ab der 5 min  $p < 0,05$ . Während durch die Behandlung mit TPT erst nach 9 min ein signifikanter Unterschied festzustellen war, konnte mit TML kein Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden.

**Tab. 8: Der Vergleich der Effekte von Organometallen auf den pH-Wert im chloridhaltigen und im chloridfreien Medium.**

Die Wirkung der Organometalle auf den pH-Wert von HL-60 Zellen wurde im chloridfreien Medium (140 mM Gluconsäure) und in Medium mit Cl<sup>-</sup> (NaCl 140 mM) untersucht. Differenzierte HL-60 Zellen, die mit BCECF beladen waren, wurden mit den Xenobiotika behandelt. Die Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzspektrometer gemessen und aus den Werten wurde der zytosolische pH-Wert bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 + 22 dargestellt. Die organometall-induzierte Veränderung des pH-Wertes im chloridhaltigen Medium wurde im Vergleich zur Veränderung im chloridfreien Medium auf Signifikanz getestet.

Behandlung	Substanz [µM]	Zeit [min]									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		Signifikanzniveau [p]									
TEL	200	n.s. <sup>1</sup>	0,05	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,005	0,005	0,005
TML	500	n.s.	0,05	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
TPT	40	0,05	0,01	0,01	0,01	0,25	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TET	500	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

<sup>1</sup> n.s. = nicht signifikant

### 3.4. Beteiligung des Calciuminfluxes an der organometall-induzierten Arachidonsäurefreisetzung

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, besteht zwischen der zytosolischen Calciumkonzentration und der Aktivität der cPLA<sub>2</sub> ein direkter Zusammenhang, d.h. die Phospholipase ist ein calciumabhängig reguliertes Enzym. Es sollte daher untersucht werden, inwieweit die von den Organometallen induzierte Arachidonsäurefreisetzung mit der beobachteten Erhöhung des Calciumspiegels im Zytosol in Zusammenhang steht. In diese Versuche wurden nur noch TBT und TEL einbezogen. Für die Experimente ist der Calciumkanalblocker Ni<sup>2+</sup> geeignet, da sich durch die Vorbehandlung mit Ni<sup>2+</sup> der Organometalleffekt auf [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> deutlich verringern ließ (Abb. 15 + 16). Nach der Vorbehandlung der Zellen mit Ni<sup>2+</sup> zeigten sich statistisch signifikante Veränderungen der Organometalleffekte auf die Arachidonsäurefreisetzung (Abb. 15 + 16, Tab. 9). So wurde die von TBT induzierte Arachidonsäurefreisetzung um 74 % reduziert, die Wirkung von TEL vollständig verhindert.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, ist die durch die Organometalle induzierte Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration von der Anwesenheit von Chloridionen im Inkubationsmedium abhängig. Es war deshalb interessant zu überprüfen, ob sich der geringere Anstieg der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> auch auf die Arachidonsäurefreisetzung auswirkt. War kein Chlorid im

Inkubationsmedium vorhanden, wurde im Falle von TEL die Arachidonsäurefreisetzung fast völlig verhindert, im Falle von TBT verringert sich der Effekt um 44 % (Tab. 9).

**Tab. 9: Die Wirkung der Organometalle auf die Arachidonsäurefreisetzung aus Membranlipiden von HL-60 Zellen.**

Differenzierte HL-60 Zellen wurden für 24 h mit radioaktiver Arachidonsäure markiert. Die Lipide der markierten Zellen wurden nach 30 min Behandlung mit TEL und TBT bzw. 10 min  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor (10  $\mu\text{M}$  A23187) extrahiert. Die Zellen waren in normalem Medium, oder in Medium ohne Chloridionen bzw. mit oder ohne Vorinkubation (2 min) mit Nickel (10 mM  $\text{Ni}^{2+}$ ) behandelt worden. Die extrahierten zellulären Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die radioaktiven Banden wurden nach ihrer Lokalisation ausgeschnitten und die Radioaktivität wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichungen (SD) aus 4 - 11 Experimenten. Die Effekte der Organometalle auf die unter normalen Bedingungen inkubierten Zellen, wurden im Vergleich zu den Effekten auf Zellen im chloridfreien Medium bzw. nach Vorbehandlung mit  $\text{Ni}^{2+}$  auf Signifikanz getestet. Die signifikanten Werte sind gekennzeichnet:  $p < 0,001$  (\*).

Behandlung Substanz	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Arachidonsäure	
		[%] $\bar{x} \pm \text{SD}$	
Kontrolle	-	0,30	$\pm 0,08$
$\text{Ni}^{2+}$ Kontrolle	-	0,38	$\pm 0,15$
$\text{Cl}^-$ -frei Kontrolle	-	0,52	$\pm 0,25$
$\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor	10	21,50	$\pm 2,25$
$\text{Cl}^-$ -frei+ $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor	10	12,10	$\pm 1,90$
TBT	10	18,50	$\pm 4,00$
$\text{Cl}^-$ -frei+TBT	10	10,94*	$\pm 3,70$
$\text{Ni}^{2+}$ +TBT	10	4,86*	$\pm 2,29$
TEL	100	4,80	$\pm 0,48$
$\text{Cl}^-$ -frei+TEL	100	0,84*	$\pm 0,50$
$\text{Ni}^{2+}$ +TEL	100	0,37*	$\pm 0,14$

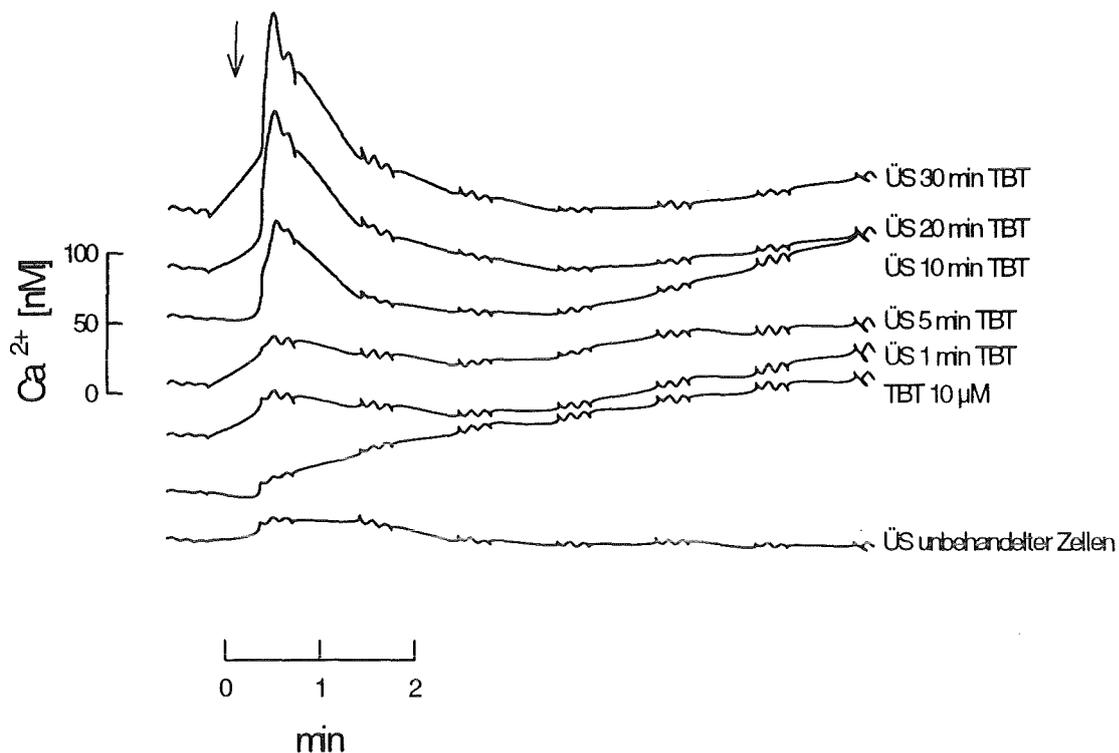
Zusätzlich wurden Versuche mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor als Kontrollstimulus durchgeführt, um zu überprüfen, ob die fehlenden Chloridionen einen Effekt auf die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> und damit auf die Arachidonsäurefreisetzung haben. Es zeigte sich, daß die cPLA<sub>2</sub> unter diesen Bedingungen nicht mehr so gut aktivierbar war.

Es ist noch anzumerken, daß die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen keinen Einfluß auf die Bildung von freier Arachidonsäure hatten.

### 3.5. Untersuchungen zur Sekretion zellulärer Faktoren mit stimulierender Funktion

Wenn HL-60 Zellen mit ausreichenden Mengen von Zinn- und Bleiverbindungen behandelt werden tritt immer freie Arachidonsäure auf (Krug & Culig, 1991; Ade *et al.*, 1996). Am stärksten wirken die untersuchten Organozinnverbindungen, denen die Organobleiverbindungen deutlich nachstehen (Tab. 9). Da Arachidonsäure in HL-60 Zellen einen Calciumeinstrom ins Zytosol induziert (Abb. 11), sollte geprüft werden, ob die Arachidonsäure selbst oder deren Metabolite, die entstehen, wenn die Zellen mit Organometallen behandelt werden, auch auf unbehandelte Zellen stimulierend wirken. Denn neutrophile Granulozyten kommunizieren über Produkte aus der Arachidonsäurekaskade mit anderen Zellen, wie z.B. Makrophagen, Mastzellen und Thrombozyten. Die Metabolite der Arachidonsäure spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, bei Allergien und Pseudoallergien, aber auch bei Schmerzphänomenen, wie der Migräne. Zusätzlich könnten die Organometalle aber auch zur Freisetzung von anderen Hormonen oder Mediatoren führen, die normalerweise für die interzelluläre Kommunikation wichtig sind. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, reagierten die HL-60 Zellen auf die Zugabe von Überständen die von Zellen gewonnen wurden die nur sehr kurz (1 - 5 min) mit TBT (10  $\mu\text{M}$ ) behandelt worden waren mit einer schwachen transienten Erhöhung des zytosolischen Calciumspiegels. Die Überstände von Zellen, die für 10, 20 und 30 min mit TBT (10  $\mu\text{M}$ ) inkubiert worden waren, induzierten in den unbehandelten Zellen eine deutliche, transiente Calciumerhöhung. Die Wirksamkeit der Überstände die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu erhöhen, stieg mit zunehmender Inkubationzeit der Zellen mit TBT immer weiter an. Es scheinen unterschiedliche Mengen von stimulierenden Substanzen gebildet zu werden.

In allen Ansätzen, mit Ausnahme der unbehandelten Kontrollen, folgte auf die transiente eine persistente Erhöhung der Calciumkonzentration, die genau der von TBT (10  $\mu\text{M}$ ) induzierten Kinetik entsprach. Sie ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß in den Überständen noch TBT vorhanden war (siehe Kapitel 2.3.). Mit den Überständen von Zellen, die mit TEL behandelt worden waren, konnten keine von den Kontrollen abweichenden Effekte erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 23: Die Wirkung von löslichen Faktoren die von HL-60 Zellen nach TBT Behandlung abgegeben wurden, auf den Calciumhaushalt von unbehandelten HL-60 Granulozyten.**

Die HL-60 Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen. Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt worden war, wurden die Zellen mit TBT ( $10 \mu\text{M}$ ) oder mit den Überständen (ÜS) von anderen TBT behandelten HL-60 Zellen inkubiert. Die Überstände wurden von unbehandelten, bzw. von Zellen, die unterschiedlich lange mit TBT ( $10 \mu\text{M}$ ) behandelt worden waren gewonnen. In den dargestellten Kurven wurden jeweils 3 Replikate zu einem Mittelwert zusammengefaßt. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 5 Experimente.

### 3.6. Untersuchungen mit niedrigen Konzentrationen der Organometalle

Die bisher dargestellten Untersuchungen wurden mit akut zytotoxischen Konzentrationen der Organometalle durchgeführt. Durch die Belastung der Umwelt ist es aber gerade in der heutigen Zeit auch wichtig, die Wirkung von niedrigen Schadstoffkonzentrationen, die über längere Zeit einwirken werden, aufzuklären. Unter diesen Umständen könnten die Xenobiotika zu subklinischen Veränderungen führen, die zunächst nicht bemerkt und später, aufgrund des unbekanntem Wirkungsmechanismus der Xenobiotika nicht mehr zugeordnet werden können. Daher ist es notwendig, Untersuchungen mit umweltrelevanten Konzentrationen durchzuführen, die eventuell zu chronischen Vergiftungserscheinungen führen. Es gibt einige Hinweise dafür, daß die Organometalle in nahezu umweltrelevanten Konzentrationen Veränderungen auf zellulärer Ebene hervorrufen. Es wurde beschrieben, daß sich nach 60 minütiger Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  TEL

die c-jun mRNA erhöht (Käfer, 1994). Weiterhin wurde das Aktgerüst von Zellen nach 18 stündiger Inkubation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  TEL sichtbar zerstört (Krug *et al.*, 1993). Die Apoptose wurde in HL-60 Zellen nach 2-3 stündiger Inkubation mit TBT (0,5  $\mu\text{M}$ ), bzw. TEL (1  $\mu\text{M}$ ) anhand einer charakteristischen "DNA Leiter", detektiert (Zaucke *et al.*, 1995). Bei allen genannten Veränderungen wird Calcium als regulatorisches Ion diskutiert. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die Organometalle auch in diesen Konzentrationen die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöhen und dadurch die genannten Veränderungen zusammen mit anderen Faktoren auslösen können.

**Tab. 10: Die Wirkung der Organometalle auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von HL-60 Zellen.**

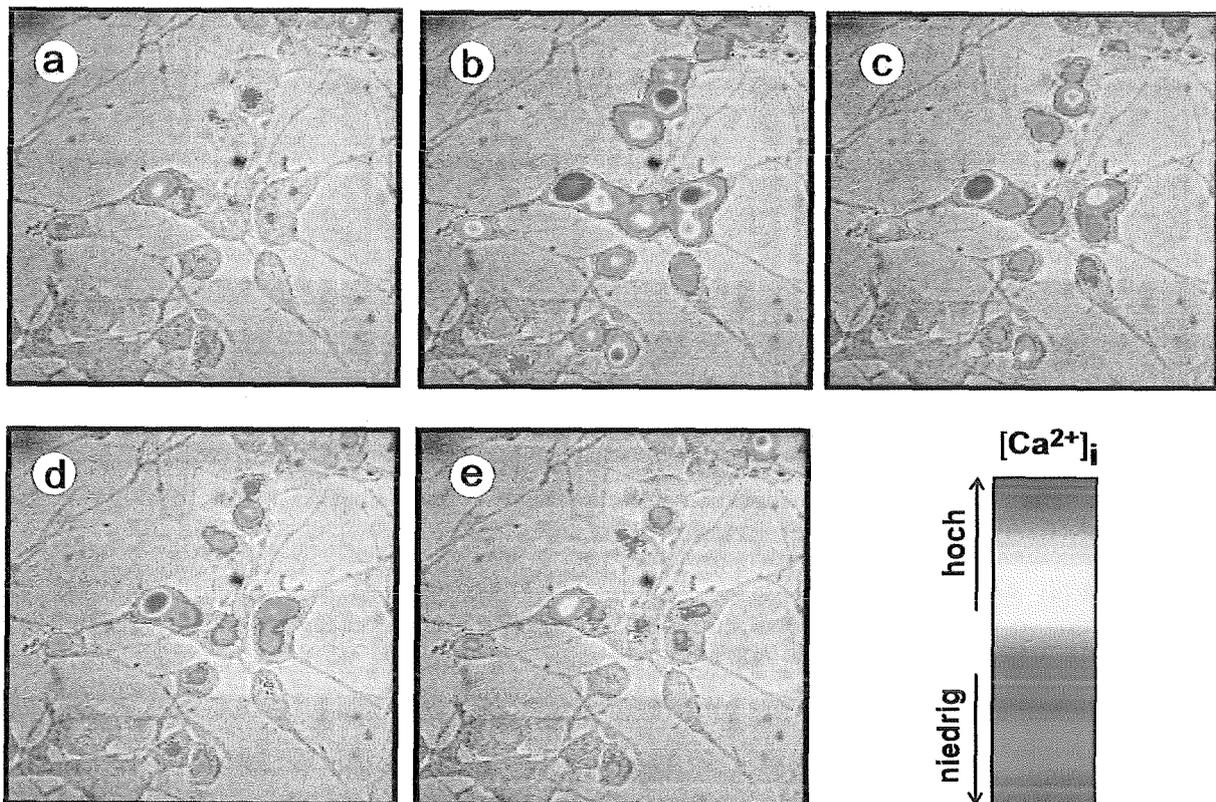
Differenzierte HL-60 Zellen wurden für 1, 4, oder 24 h mit TBT oder TEL behandelt. Vor Ablauf der angegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen in Medium, dem die Organometalle in der entsprechenden Konzentration zugesetzt worden waren, mit Fluo-3 beladen. Anschließend wurde die zytosolische Calciumkonzentration der Zellen im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichungen (SD) von 2 - 3 Experimenten. Die signifikanten Werte sind gekennzeichnet:  $p < 0,01$  (\*).

Behandlung		Zeit h	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ [nM] $\bar{x} \pm \text{SD}$
Substanz	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]		
Kontrolle	-	1	$50 \pm 1,7$
Kontrolle	-	4	$53 \pm 2,2$
Kontrolle	-	24	52
TBT	1	1	$107^* \pm 17$
TBT	1	4	$277^* \pm 66$
TBT	0,1	24	50
TEL	10	1	$343^* \pm 82$
TEL	1	24	50

Wie der Tabelle 10 zu entnehmen ist, erhöhte sich die zytosolische Calciumkonzentration von HL-60 Zellen nach einstündiger Behandlung mit TEL (10  $\mu\text{M}$ ) sehr stark und nach Behandlung mit TBT (1  $\mu\text{M}$ ) stieg sie um ca. 100 %. Eine längere Inkubationszeit (4h) bewirkte bei gleicher Konzentration eine Verstärkung des Effekts von TBT. Nach Reduktion der Dosis (TBT 0,1  $\mu\text{M}$ , TEL 1  $\mu\text{M}$ ) war auch nach 24 h keine Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  detektierbar. Die Zellen reagierten in diesen Versuchen, auf eine an die Organometallbehandlung folgende Stimulierung mit fMLP, wie die unbehandelten Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt).

### 3.7. Organometalle und der Calciumhaushalt von neuronalen Zellen in Kultur

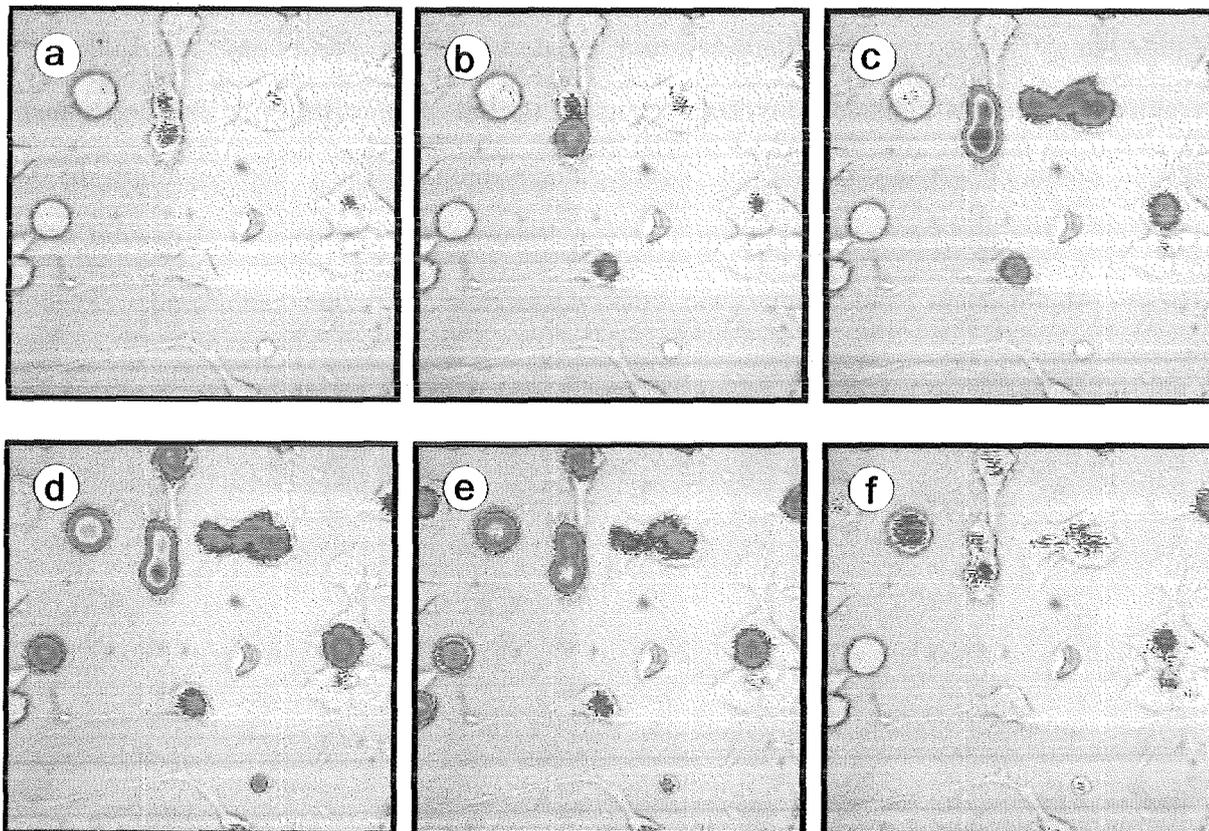
Neben den immunotoxischen Wirkungen der Organometalle ist ihre neurotoxische Wirkung von besonderem Interesse. In der Literatur wurden mehrere calciumabhängige Schädigungen von Nervenzellen beschrieben. Die Behandlung von kultivierten Nervenzellen mit Bleiverbindungen, führte zu Störungen im Neuritenwachstum (Audesirk *et al.*, 1989) und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen im Hippocampus (LeBel *et al.*, 1990). Die Organometalle induzieren die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren (Glutamat und Aspartat), die durch persistente Erregung den massenhaften Tod von Nervenzellen verursachen (Vos *et al.*, 1989). Diese Aminosäuren induzieren wie die Organometalle eine anhaltende Erhöhung



**Abb. 24: Die Wirkung von Bradykinin auf die zytosolische Calciumkonzentration von differenzierten NG108-15 Zellen.**

Die NG-Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen und durch ein Objektiv (40/0,65) zunächst die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen aufgenommen (a). Anschließend wurde mit Bradykinin (10  $\mu\text{M}$ ) stimuliert und in Intervallen von 7,5 s die Fluoreszenz der Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Fluoreszenzwerte nach 7,5 s (b), 15 s (c), 22,5 s (d) und nach 45 s (e). Die von der Kamera aufgezeichnete Fluoreszenz wurde mittels Bildanalyse zunächst in Graustufen und dann in Farben konvertiert. Die Falschfarbenbilder wurden einem Durchlichtbild überlagert, das die Zellen in ca. 250facher Vergrößerung zeigt. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 5 Experimente.

der zytosolischen freien Calciumkonzentration, die letztendlich zum Absterben der Zellen führt (Irvin *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994). Aus methodischen Gründen wurden die Untersuchungen zur Wirkung der Zinn- und Bleiverbindungen auf den Calciumhaushalt der NG108-15 Zelllinie mittels Videoanalysen durchgeführt. Die Videoanalyse ermöglicht neben



**Abb. 25: Die Wirkung des plättchenaktivierenden Faktors (PAF) auf die zytosolische Calciumkonzentration von differenzierten NG108-15 Zellen.**

Vor der Stimulierung der NG-Zellen mit PAF (1  $\mu\text{M}$ ) wurde die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt (a). Anschließend wurde nach 7,5 s (b), 15 s (c), 22,5 s (d) 30 s (e) und nach 37,5 s (f) die Fluoreszenz in den Zellen aufgezeichnet. Die Ergebnisse stehen stellvertretend für 3 Experimente. Detaillierte Angaben finden sich in Abbildung 24.

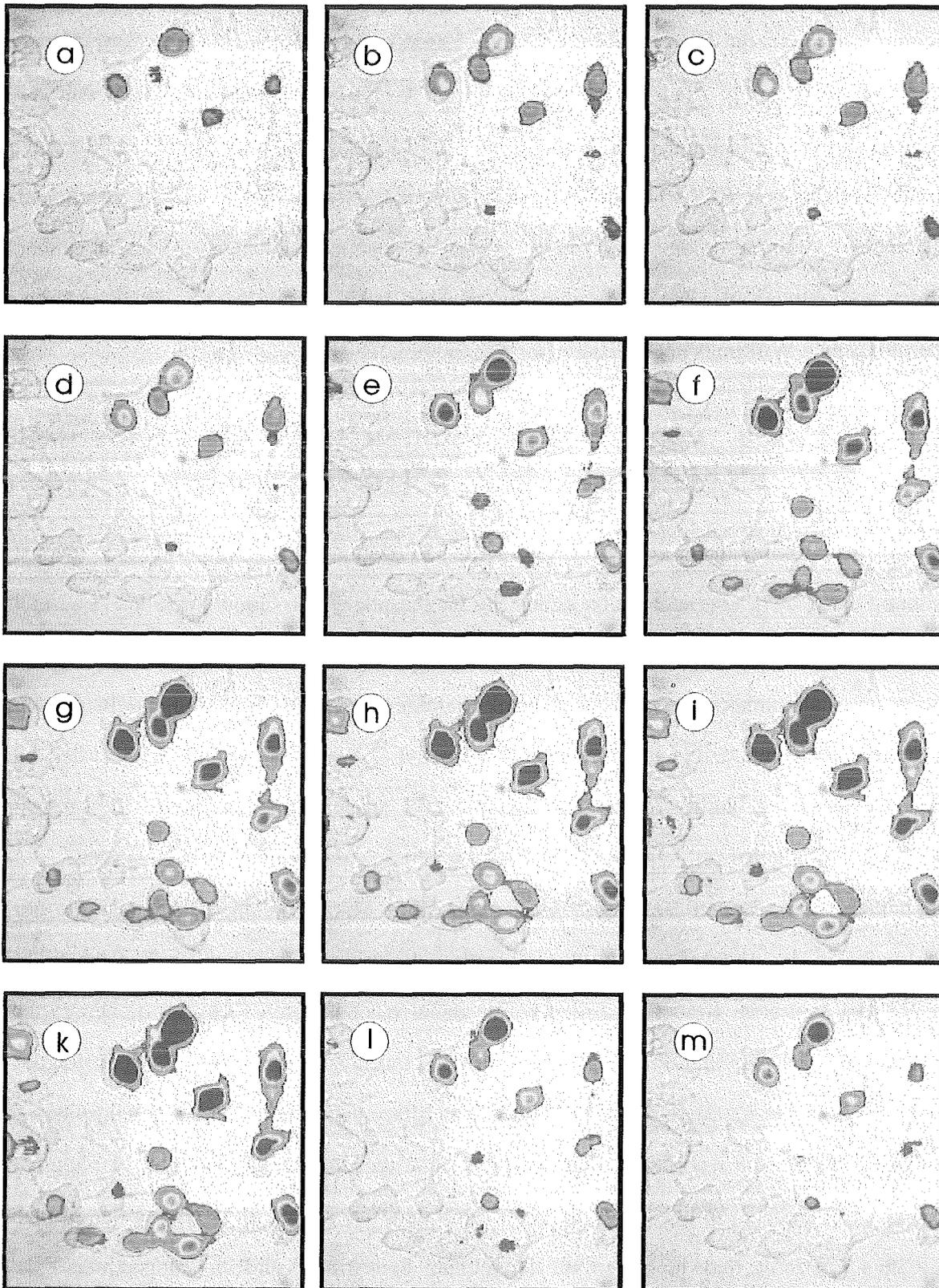
der zeitlichen auch eine räumliche Auflösung des Fluoreszenzsignals. Da die NG-Zellen auf die Stimulierung mit bestimmten Hormonen mit Calciumwellen bzw. Calciumoszillationen antworten, sollte untersucht werden, ob auch die Organometalle solche Signalmuster generieren. Um die Methode zu etablieren, wurden die Reaktionen der NG-Zellen auf bestimmte Hormone aufgezeichnet. Wie aus den Abbildungen 24 + 25 hervorgeht, ließen sich die Zellen z.B. mit Bradykinin (10  $\mu\text{M}$ ) und dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF, 1  $\mu\text{M}$ ) stimulieren, wobei von Bradykinin in niedrigeren Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$ ) Calciumoszillationen induziert wurden (Videodokumentation). Wie schon in den Versuchen mit den HL-60 Zellen beobachtet werden

konnte, reagierten die Zellen sofort nach der Zugabe der Stimulanzen mit einer transienten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Auch der Neurotransmitter Acetylcholin induzierte Calciumströme und zwar durch Depolarisation der Plasmamembran. Eine Depolarisation der Membran ließ sich auch mittels Zugabe von KCl (50 mM) auslösen. Die dadurch erzeugten starken Calciumströme entstanden durch die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (Videodokumentation). Die Videoanalysen eignen sich demnach zur Untersuchung der neurotoxischen Wirkungsmechanismen der Organometalle.

### **3.7.1. Effekte von Organometallen auf die zytosolische Calciumkonzentration von NG108-15 Zellen**

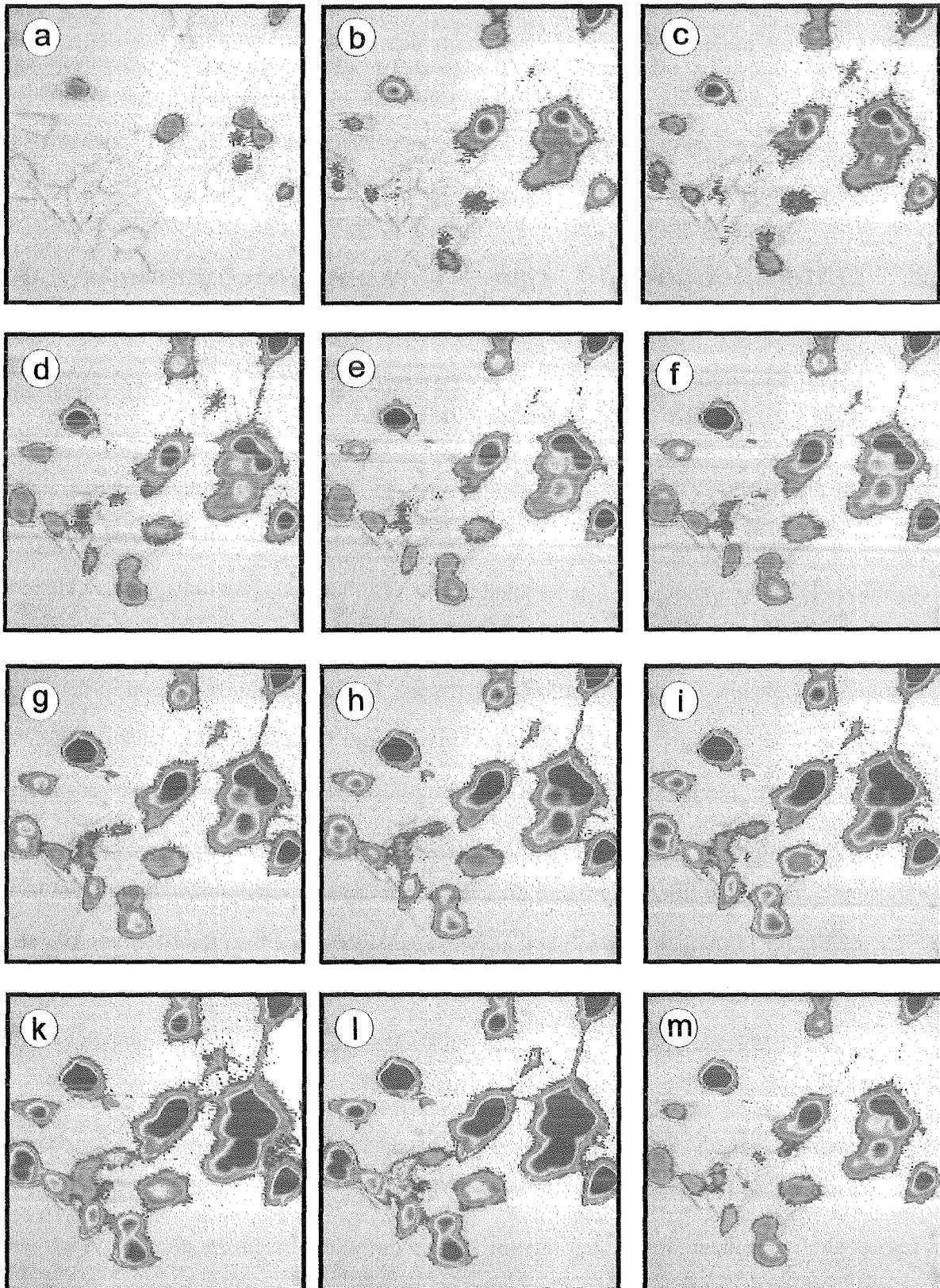
Wie aus den Abbildungen 26 + 27 hervorgeht, induzierten TEL und TBT eine persistente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  von neuronalen Zellen. Im Gegensatz zu den Organometallen bewirkten die Rezeptoragonisten (Bradykinin, PAF) Calciumströme, die durch einen schnellen und transienten Anstieg der Calciumkonzentration im Zytosol charakterisiert sind. Somit entspricht die Kinetik des organometall-induzierten Calciumeinstroms ins Zytosol in etwa der, die auch in den HL-60 Zellen nachgewiesen wurde. Durch die Organometalle ausgelöste Calciumoszillationen konnten im technisch möglichen zeitlichen Auflösungsbereich (0,5 s) nicht nachgewiesen werden.

In den hier beschriebenen Versuchen wurde mit einer Mikrokapillare gearbeitet, aus der die Xenobiotika in der angegebenen Endkonzentration durch einen anstehenden konstanten Druck von 2-3 hPa austraten. Keine der Zellen wurde daher einer höheren Konzentrationen exponiert, wie es z.B. mit der Applikation einer konzentrierten Stammlösung zu einer Zellsuspension der Fall sein kann. Die Mikrokapillare wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators an der gewünschten Stelle positioniert. Durch die Anordnung der Geräte erfolgte dies von rechts, wodurch die applizierten Lösungen von rechts nach links über die Zellen strömten. Die genaue Betrachtung der Aufnahmen (Abb. 26 + 27) zeigt, daß die Zellen auf der rechten Seite früher und im untersuchten Zeitraum auch stärker auf die Organometalle reagierten. Zellen, die sich in größerer Entfernung von der Mikrokapillare befanden, waren durch den Verdünnungseffekt nur geringen Konzentrationen ausgesetzt. Die Volumina, die im Untersuchungszeitraum appliziert wurden, betragen nur 1-4  $\mu$ l, während sich die Zellen in 2 ml Kulturmedium befanden.



**Abb. 26: Die Wirkung von TEL (200  $\mu\text{M}$ ) auf die zytosolische Calciumkonzentration von differenzierten NG108-15 Zellen.**

Die NG-Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen. Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen bestimmt worden war (a), wurde TEL (200  $\mu\text{M}$ ) mit einer Mikrokapillare appliziert. Die Fluoreszenz wurde nach 2 min (b) und im Anschluß daran in Intervallen von 1 min von der ersten min bis zur zehnten Minute (c-k) bestimmt. Danach wurde die Mikrokapillare entfernt, dem Inkubationsmedium  $\text{Mn}^{2+}$  (10 mM) zugegeben und die Fluoreszenz nach 30 s (l) und 60 s (m) aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 10 Experimente. Detaillierte Angaben finden sich in Abbildung 24.



**Abb. 27: Die Wirkung von TBT (20  $\mu\text{M}$ ) auf die zytosolische Calciumkonzentration von differenzierten NG108-15 Zellen.**

Die Fluoreszenz der unbehandelten NG-Zellen wurden bestimmt nachdem die Zellen mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen worden waren (a). Dann wurde TBT (20  $\mu\text{M}$ ) mit einer Mikrokapillare appliziert. Die Fluoreszenz wurde in Intervallen von 1 min von der ersten bis zur zehnten Minute bestimmt (b-k). Danach wurde die Mikrokapillare entfernt, dem Inkubationsmedium  $\text{Mn}^{2+}$  (10 mM) zugesetzt und die Fluoreszenz nach 30 s (l) und 60 s (m) aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 8 Experimente. Detaillierte Angaben finden sich in Abbildung 24.

Um ausschließen zu können, daß die Zellen durch die Perifusion stimuliert werden, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. In diesen Experimenten, in denen Zellen mit Kulturmedium aus der Mikrokapillare überströmt wurden, konnte kein Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  nachgewiesen werden. (Daten nicht gezeigt).

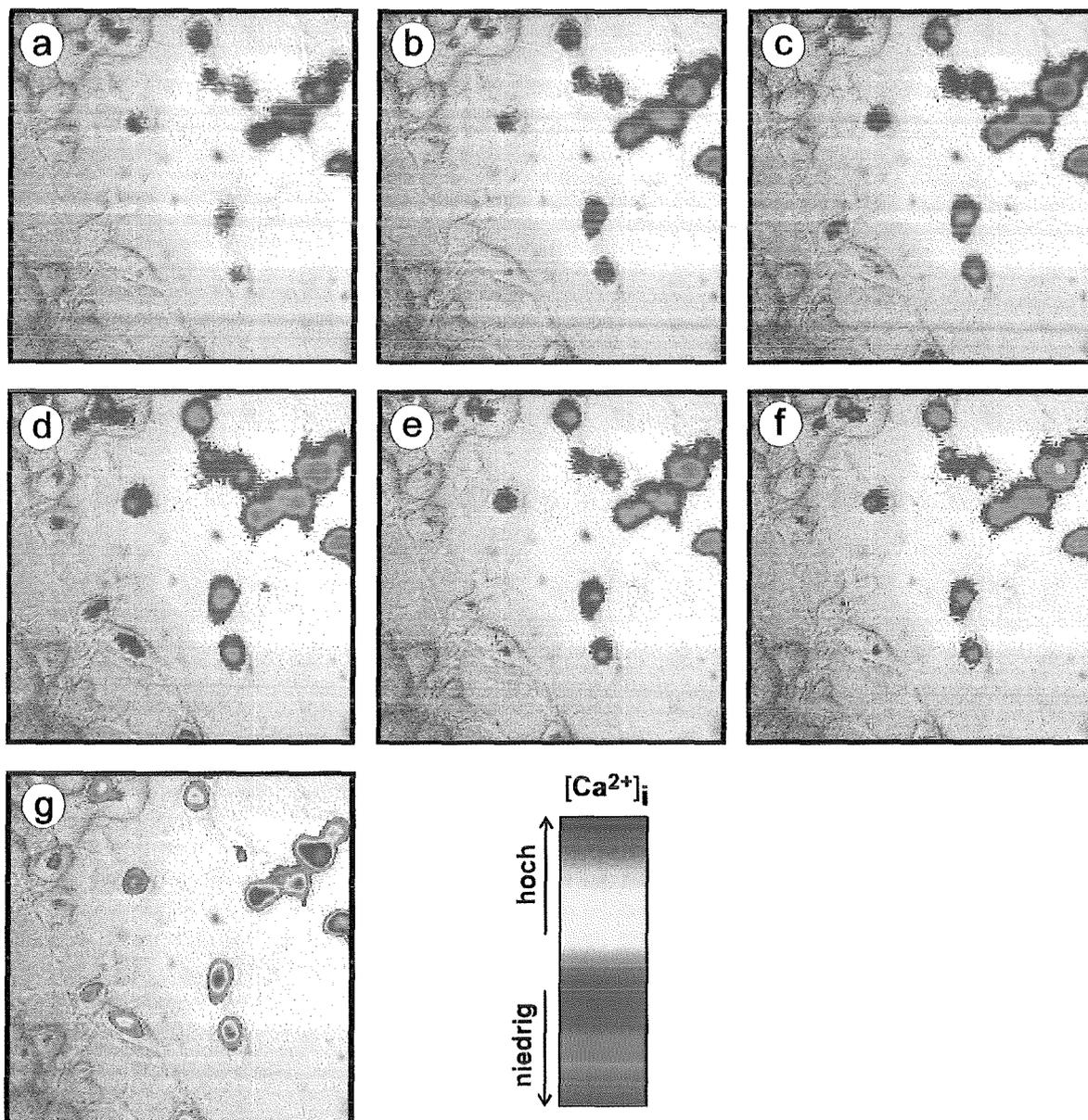
### **3.7.2. Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Organometalle in NG108-15 Zellen**

#### **3.7.2.1. Untersuchungen zur Beteiligung des extrazellulären Calciums am Organometalleffekt**

Wie schon für die HL-60 Zellen gezeigt werden konnte, spielt das extrazelluläre Calcium auch in den NG108-15 Zellen eine wichtige Rolle für den Effekt der Organometalle auf die  $[Ca^{2+}]_i$ . Im calciumfreien Medium konnten die Organometalle keine Erhöhung des Calciumspiegels induzieren (Abb. 28 + 29). Wurde dem Medium jedoch nach der 10 minütigen Organometallbehandlung mit den Xenobiotika Calcium zugesetzt (6 mM  $CaCl_2$ ), stieg die Calciumkonzentration in den Zellen sofort rapide an. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Organometalle Calciuminfluxwege aktivieren. Die Zellen, die weiter von der Kapillare entfernt waren, reagierten nach der Zugabe von  $CaCl_2$  mit einem deutlich schwächeren Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 28 g; 29 d). Dieser Effekt ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß die geringeren Organometallkonzentrationen in weiter entfernten Zellen zur Öffnung von weniger Calciumkanälen führen. Diese Beobachtung bestätigte sich auch nach dem Verschieben des Objektisches in Zellen, die aufgrund der noch größeren Entfernung von der Mikrokapillare noch niedrigeren Konzentrationen der Verbindungen exponiert waren (Abb. 29 e).

Allerdings kann in einem EGTA haltigen Medium auch die Entleerung der intrazellulären Speicher, entsprechend dem kapazitativen Modell, die Öffnung von Calciumkanälen bewirken. Dies zeigen die Experimente mit Zellen, die für 10 min in calciumfreiem Medium inkubiert waren und auf die Zugabe von Calcium ebenfalls mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  reagierten (Abb. 30). Dieses Experiment diente auch als Kontrolle um den Effekt des EGTA-Mediums zu überprüfen. Es zeigt, daß sich vor der Zugabe von Calcium die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht verändert. Mit Thapsigargin konnte nach Entleerung der intrazellulären Speicher die Öffnung von Calciumkanälen in der

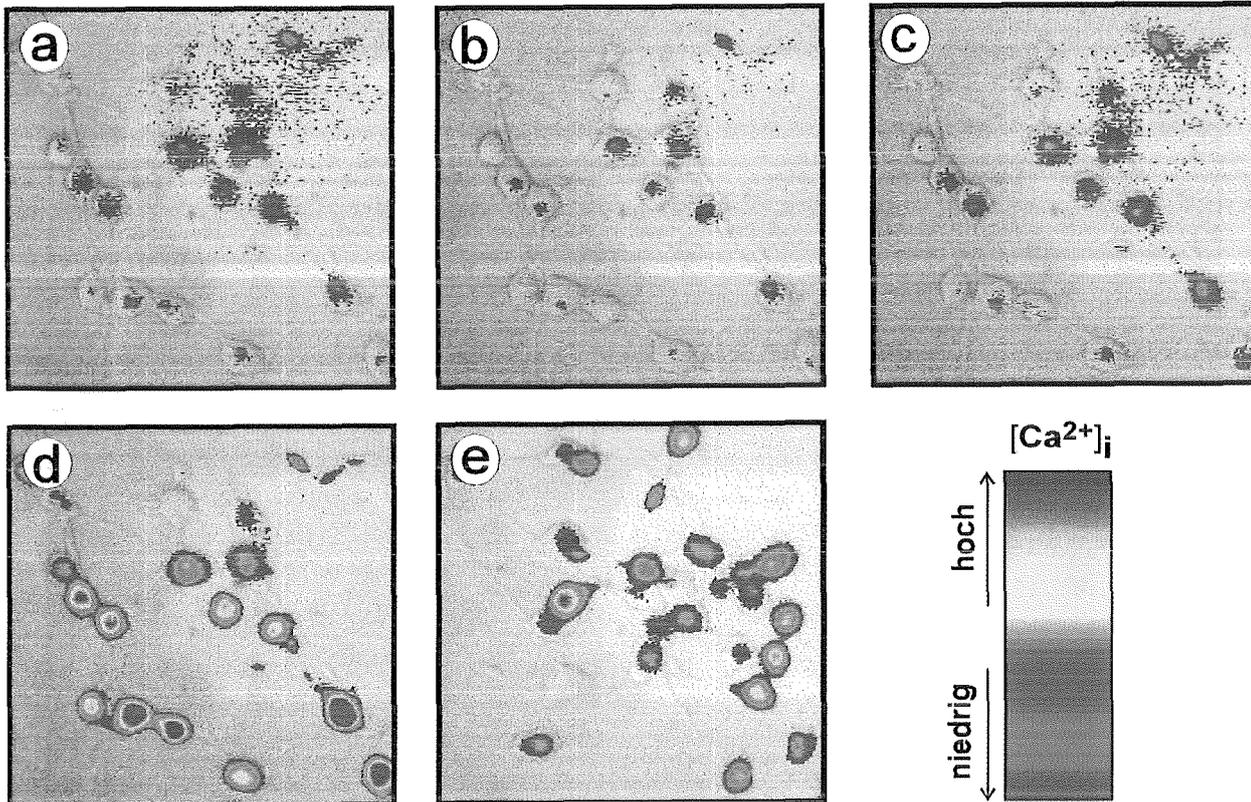
Plasmamembran ebenfalls demonstriert werden, denn durch die Zugabe von Calcium zum calciumfreien Inkubationsmedium kommt es zu einem Calciuminflux ins Zytosol (Abb. 31). Der entscheidende Unterschied zu den organometall-behandelten Zellen ist aber, daß alle Zellen unabhängig von ihrer Position gleichmäßig auf die Zugabe von Calcium reagierten (Abb. 30 + 31).



**Abb. 28: Die Wirkung von TEL (200 µM) auf die zytosolische Calciumkonzentration von differenzierten NG108-15 Zellen in calciumfreiem Medium.**

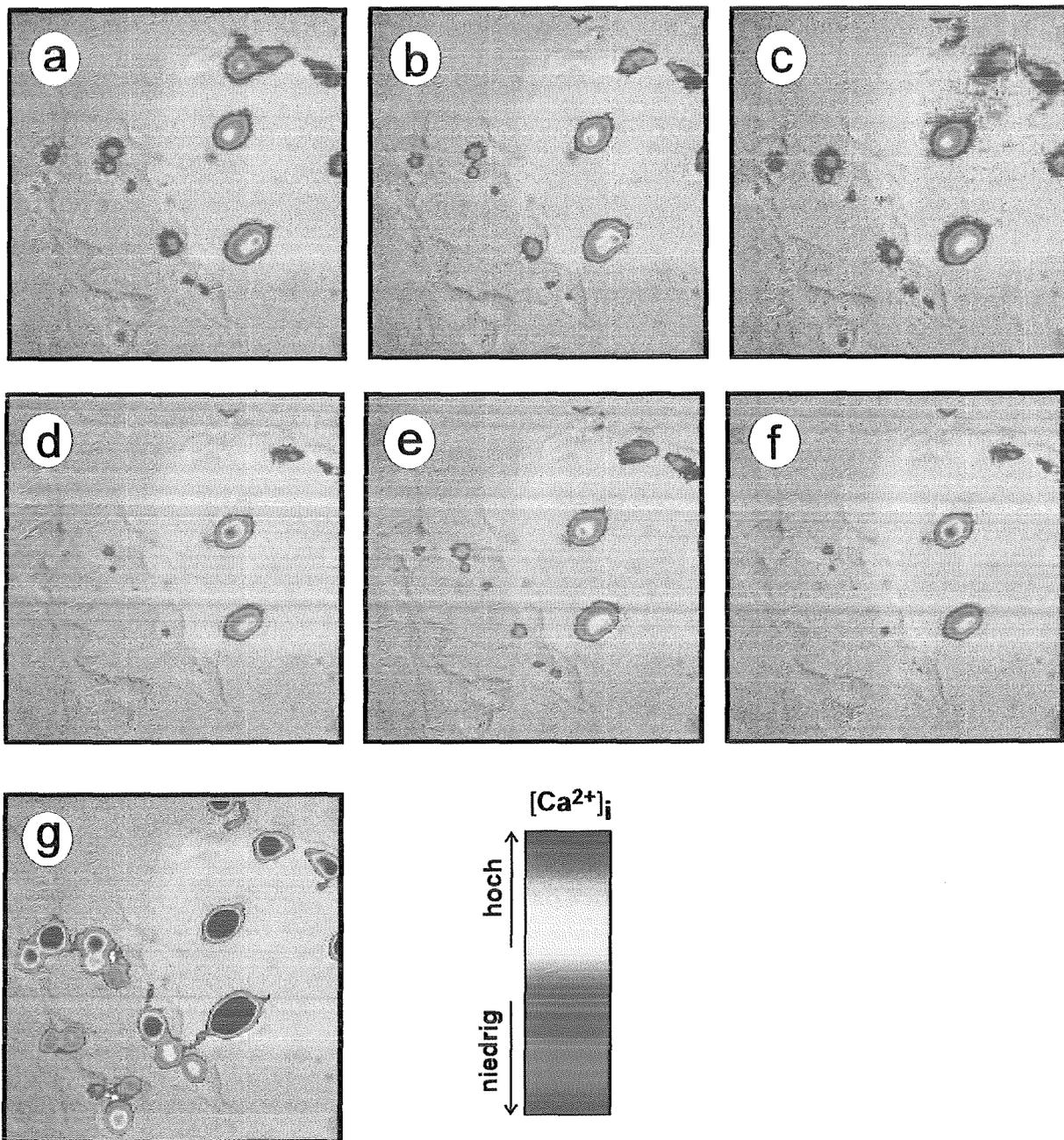
Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen in calciumfreiem Medium (EGTA 3 mM) bestimmt worden war (a), wurde TEL (200 µM) mit einer Mikrokapillare appliziert. Die Fluoreszenz wurde in Intervallen von 1 min bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 (b), 4 (c), 6 (d), 8 (e) und 10 min (f). Danach wurde die Mikrokapillare entfernt, dem Inkubationsmedium  $\text{Ca}^{2+}$  (6 mM) zugegeben und die Fluoreszenz nach 30 s (g) aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 Experimente. Detaillierte Angaben finden sich in Abbildung 24.

Eine Depolarisation des Membranpotentials, als auslösender Faktor für den Calciuminflux durch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (6 mM) ist unwahrscheinlich, da die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zu Zellen, die im calciumhaltigen Medium inkubiert waren, keine Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzieren konnte (Daten nicht gezeigt).



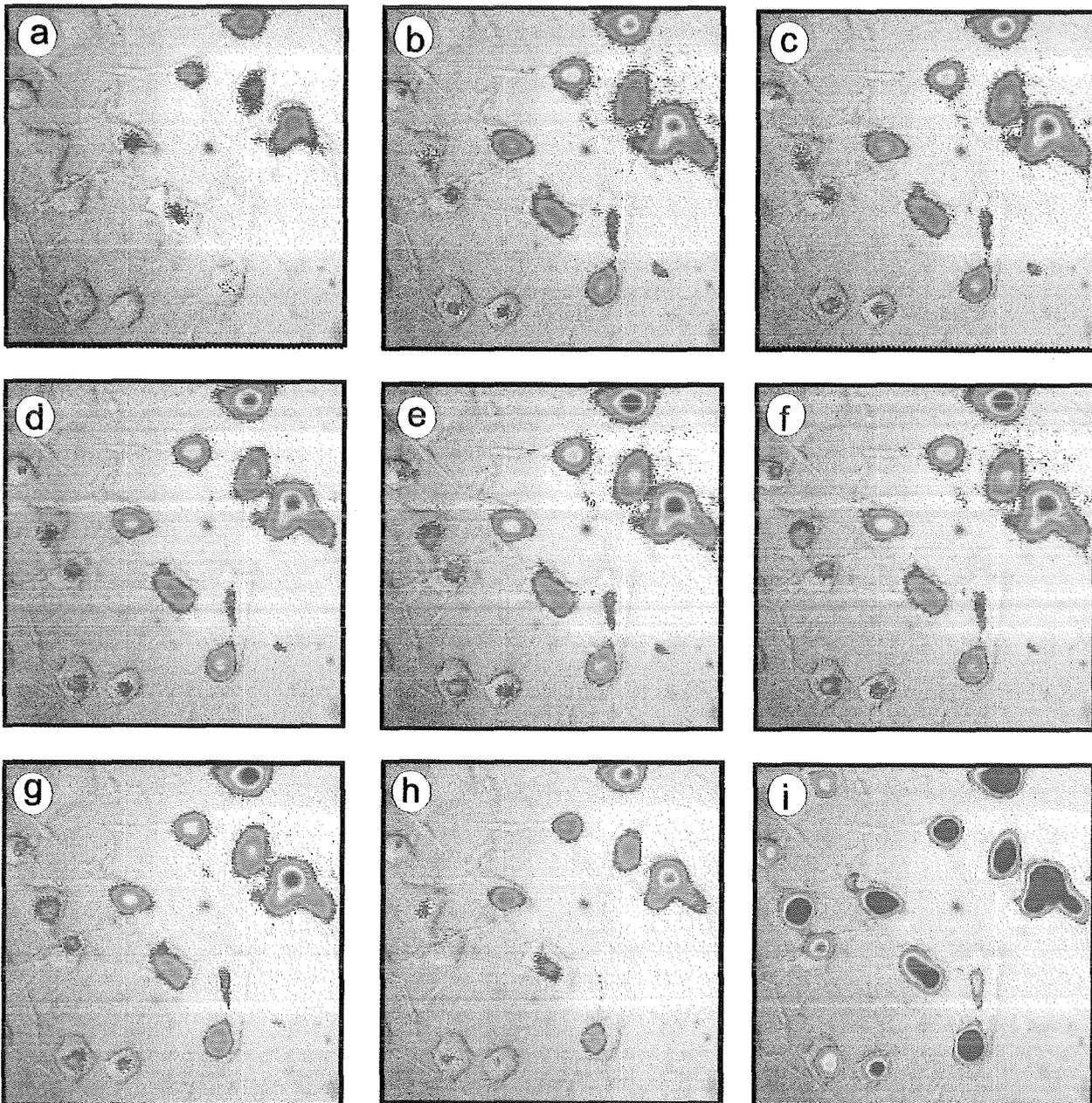
**Abb. 29: Die Wirkung von TBT (20  $\mu\text{M}$ ) auf die zytosolische Calciumkonzentration von differenzierten NG108-15 Zellen in calciumfreiem Medium.**

Die NG-Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-3 beladen. Nachdem die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen in calciumfreiem Medium (EGTA 3 mM) bestimmt worden war (a), wurde TBT (20  $\mu\text{M}$ ) aus einer Mikrokapillare appliziert und die Fluoreszenz in Intervallen von einer Minute bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 5 (b) und 10 min (c). Dem Inkubationsmedium wurde anschließend  $\text{Ca}^{2+}$  (6 mM) zugesetzt und die Fluoreszenz nach 30 s aufgezeichnet (d). Sofort danach wurde die Fluoreszenz von weit entfernt liegenden Zellen gemessen. Diese Zellen waren aufgrund ihres Abstandes von der Mikrokapillare nur sehr geringen Konzentrationen von TBT exponiert (e). Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 Experimente. Details finden sich in der Legende von Abbildung 24.



**Abb. 30: Die Wirkung von Ca<sup>2+</sup> auf Zellen nach der Inkubation in calciumfreiem Medium.**

Zunächst wurde die Fluoreszenz der Zellen in calciumfreiem Medium (EGTA 3 mM) bestimmt, während calciumfreies Medium mit einer Mikrokapillare appliziert wurde. Die Fluoreszenz wurde in Intervallen von einer Minute aufgezeichnet. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 (b), 4 (c), 6 (d), 8 (e) und 10 min (f). Danach wurde die Mikrokapillare entfernt und die Fluoreszenz bestimmt, nachdem dem Inkubationsmedium Ca<sup>2+</sup> (6 mM) zugesetzt worden war. Dargestellt ist die Fluoreszenz nach 30 s (g). Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 Experimente. Details finden sich in der Legende von Abbildung 24.

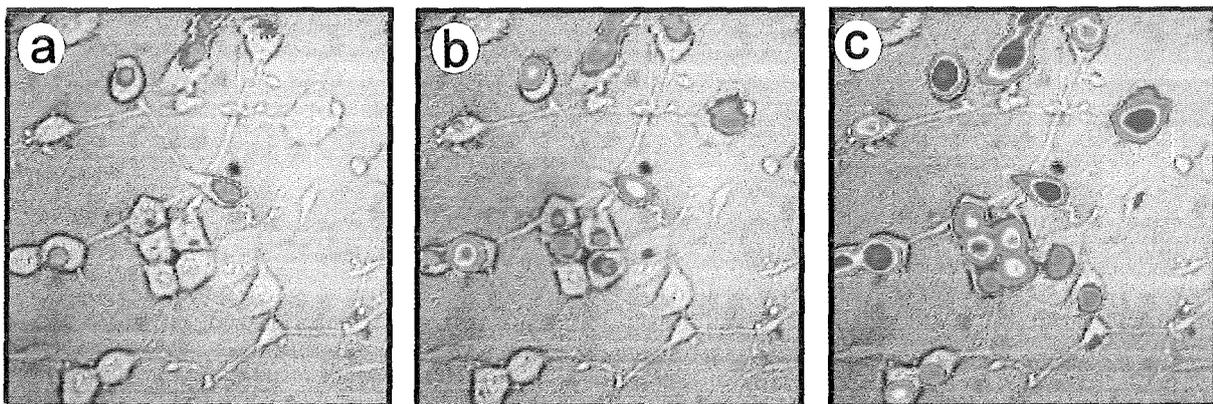


**Abb. 31: Die Wirkung von Thapsigargin (100 nM) auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von differenzierten NG108-15 Zellen in calciumfreiem Medium.**

Die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen in calciumfreiem Medium (EGTA 3 mM) wurde bestimmt (a) und anschließend wurde Thapsigargin aus einer Pipette appliziert. Die Fluoreszenz wurde in Intervallen von einer Minute bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse nach 2 (b), 3 (c), 4 (d), 5 (e), 6 (f), 8 (g) und 10 min (h). Danach wurde die Mikrokapillare entfernt und die Fluoreszenz wurde 30 s (i) nachdem  $Ca^{2+}$  (6 mM) zugesetzt worden war aufgezeichnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 Experimente. Details finden sich in der Legende von Abbildung 24.

### 3.7.2.2. Effekte der Organometalle auf die Calciumkanäle neuronaler Zellen

Mit Hilfe von Mangan und dem Calciumkanalblocker Verapamil untersucht werden, ob der Calciumeinstrom ins Zytosol wie vermutet durch Calciumkanäle erfolgt. Die NG108-15 Zellen besitzen wie Nervenzellen unterschiedliche Calciumkanäle. Die spannungsabhängigen Kanäle (HVA, high voltage activated), die nach pharmakologischen Gesichtspunkten in L-, N-, Q-, und P-Typ eingeteilt werden, können durch  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  blockiert werden (Kasai & Neher, 1991). Im Gegensatz zu den Calciumkanälen von HL-60 Zellen die für  $\text{Mn}^{2+}$  durchlässig sind kann  $\text{Mn}^{2+}$  also durch spannungsabhängige Kanäle nicht in die NG108-15 Zellen einströmen. Es wurde aber beschrieben, daß nach der Stimulierung der NG108-15 mit Bradykinin, ein Kanal in der Plasmamembran geöffnet wird, der für  $\text{Ca}^{2+}$  und für  $\text{Mn}^{2+}$  durchlässig ist (Ogura *et al.*, 1990). Die beobachtete Wirkung von  $\text{Mn}^{2+}$  (Abb. 26 l, m u. 27 m) ist somit entweder auf die Blockade von Calciumkanälen und/oder auf den Einstrom von  $\text{Mn}^{2+}$  ins Zytosol zurückzuführen, da  $\text{Mn}^{2+}$ , wenn es in die Zellen gelangt die Fluoreszenz von Fluo-3 löscht. Eine eindeutige Identifizierung der Kanäle, durch die Calcium ins Zytosol strömt, ist daher auf der Basis dieser Versuche nicht möglich. Die Experimente zeigen aber, daß Calciumkanäle im Zusammenhang mit der Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch die Organometalle eine wichtige Rolle spielen.



**Abb. 32: Die Wirkung von TBT auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  von differenzierten NG108-15 Zellen nach Vorinkubation mit Verapamil.**

Die Fluoreszenz der NG-Zellen wurde nach Vorinkubation mit Verapamil ( $100 \mu\text{M}$ , 3 min) bestimmt (a). Anschließend wurden die NG-Zellen mit TBT ( $20 \mu\text{M}$ ) behandelt und die Fluoreszenz in Intervallen von einer Minute gemessen. Dargestellt ist die Fluoreszenz der Zellen nach 10 min (b). Danach wurde dem Inkubationsmedium  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor ( $10 \mu\text{M}$ ) zugesetzt, und die Fluoreszenz der Zellen nach 15 s (c) aufgezeichnet. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für 5 Experimente. Details finden sich in der Legende von Abbildung 24.

Deshalb wurden zusätzlich Versuche mit Verapamil durchgeführt. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die Organometalle bestimmte spannungsabhängige Calciumkanäle öffnen (Abb. 32 a + b). Verapamil hemmt vor allem Calciumströme durch Kanäle des L-Typs. Durch die anschließende Behandlung der NG108-15 Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor konnte gezeigt werden, daß die Zellen stimulierbar sind (Abb. 32 c).

---

## 4. DISKUSSION

Wenn Xenobiotika über die Lunge, die Haut oder mit der Diät in den Körper gelangen, können sie, nachdem sie die Schranke der Epithelien überwunden haben, in die extrazelluläre Flüssigkeit übertreten und damit in den Blut- und Lymphstrom eintreten. Dort treffen sie auf Blutzellen, oder sie breiten sich mit dem Blutplasma im Körper aus und erreichen ihre Zielorgane wie z.B. das ZNS und die Leber. Die Xenobiotika gelangen somit zu vielen verschiedenen Zellen und insbesondere die Plasmamembran mit ihren vielfältigen und hochspezifischen Strukturen, die für die Kommunikation der Zellen mit dem Organismus von Bedeutung sind, werden zuerst von den Fremdstoffen erreicht.

In den letzten Jahrzehnten wurde klar, daß die Aktivierung von vielen Zelltypen mit der Erhöhung der zytosolischen freien Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), die an der Plasmamembran initiiert wird, einhergeht. Neben den spannungsabhängigen Calciumströmen der erregbaren Zellen gibt es in fast allen Zellen die rezeptor-gekoppelte Calciummobilisierung. Viele Hormone binden an Rezeptoren der Zytoplasmamembran und induzieren dadurch eine transiente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , die unterschiedlichste Prozesse regulieren kann. Beispiele sind die Muskelkontraktion, die Sekretion von neurokrinen, exokrinen, endokrinen und parakrinen Produkten, die Aktivierung von Blutzellen, die Glykogenolyse, die Glukoneogenese, das Zellwachstum, die Zellteilung und die Differenzierung.

Die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Organometalle kann sich also auf viele Prozesse auswirken, die in der Zelle strikt geregelt ablaufen müssen. Die in Tierversuchen beobachtete neuro- und immunotoxische Wirkung, der in dieser Arbeit untersuchten Organometalle, könnte mit einer Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in Zusammenhang stehen. Die Rolle der  $[Ca^{2+}]_i$  beim Zelltod nach der Behandlung mit Xenobiotika wurde schon ausführlich diskutiert (Boobis *et al.*, 1989; Orrenius *et al.*, 1989; Corcoran & Ray, 1992). Als Beispiele seien an dieser Stelle die Aktivierung von calciumabhängigen Proteasen, Endonucleasen und Phospholipasen genannt.

Neben diesem fundierten theoretischen Ansatz sprachen auch experimentelle Befunde für die Untersuchung der Wirkung der Organometalle auf die  $[Ca^{2+}]_i$  von Zellen. Es wurde gezeigt, daß trialkylierte Zinn- und Bleiverbindungen die cPLA<sub>2</sub> aktivieren (Käfer *et al.*, 1992; Ade *et al.*, 1995). Bei weiteren Untersuchungen wurden calcium-antagonistische Pharmaka

eingesetzt, die den Zusammenhang zwischen der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> und der Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration immer deutlicher werden ließen. Eindrucksvoll war diese Beziehung in Experimenten mit dem Calciumchelator EGTA, der die Arachidonsäurefreisetzung durch die Behandlung mit Organometallen effektiv hemmen konnte nachzuweisen (Käfer & Krug, 1994). Bei HL-60 Zellen ist die Mobilisierung von Calcium aus intrazellulären Speichern oder ein Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum unbedingt erforderlich, um die cPLA<sub>2</sub> vollständig zu aktivieren (Xing & Mattera, 1992). Zusätzlich wird die Aktivierung durch eine Phosphorylierung des Enzym verstärkt (Lin *et al.*, 1993; Dennis, 1994). Diese Daten führten zu der Arbeitshypothese, daß die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> nicht direkt durch die Organometalle erfolgt, sondern durch einen Calciumeinstrom ins Zytosol induziert wird.

Die Organometalle bewirken auch Veränderungen des Zytoskeletts von HL-60 Granulozyten bzw. Neutrophilen (Marinovich *et al.*, 1990; Käfer *et al.*, 1992) und NRK-Zellen (Käfer, 1994), die ebenfalls auf Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  zurückzuführen sein könnten, da die Aktin- und Tubulinpolymerisation stark von der Calciumkonzentration abhängig ist.

Die Organometalle wurden in dieser Arbeit in akut toxischen Konzentrationen eingesetzt, die durch Vitalitätstests bestimmt wurden und die im Untersuchungszeitraum zu keinem Vitalitätsverlust führten, aber effizient eine Arachidonsäurefreisetzung auslösten (Käfer *et al.*, 1992; Krug 1992; Zaucke, 1993). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Arbeitshypothese zu bestätigen, daß die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> nicht direkt durch die Organometalle erfolgt, sondern auf die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  zurückzuführen ist. Deshalb wurden die Untersuchungen zur Calciumhomöostase zunächst mit den Konzentrationen durchgeführt, die auch die Arachidonsäurefreisetzung bewirkten. Von allen Substanzen wurden noch weitere Konzentrationen getestet, da bestimmt werden sollte, welche Konzentration gerade noch einen Effekt hervorruft. Die Konzentrationsbereiche, die bearbeitet wurden, lagen je nach Substanz zwischen dem 1-12 fachen der LC<sub>50</sub> nach 2 stündiger Inkubationszeit mit den Organometallen. Zusätzlich wurden die Wirkungen von einigen Substanzen in umweltrelevanten Konzentrationen untersucht, um mögliche chronische Effekte der Organometalle aufzuzeigen.

### Die Veränderung der zytosolischen freien Calciumkonzentration durch Organometalle

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß trialkylierte und triarylierte Blei- und Zinnverbindungen zu einer persistenten Erhöhung der zytosolischen freien Calciumkonzentration von HL-60 Zellen führen (Abb. 7 + 8, Tab. 2 + 3). Eine Ausnahme stellten DBT und TMT dar, die selbst in millimolaren Konzentrationen nur einen schwachen bzw. keinen Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  hatten. Diese beiden Verbindungen, wie auch TBTO wurden in die mechanistischen Studien nicht einbezogen.

Auch andere Arbeitsgruppen haben an so unterschiedlichen Zellen, wie Hepatozyten (Carini *et al.*, 1994), Thymozyten (Aw *et al.*, 1990; Chow *et al.*, 1992; Oyama *et al.*, 1994) und neuronalen Zellen (Oyama *et al.*, 1993; Sarafian, 1993) die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nachgewiesen, nachdem die Zellen der Zinnverbindung TBT exponiert worden waren. Im Fall der Bleiverbindungen konnte in Hepatozyten (Albano *et al.*, 1994) und bei Synaptosomen (Komulainen & Bondy, 1987) eine persistente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  nachgewiesen werden.

Der in den HL-60 Zellen beobachtete Effekt war von der eingesetzten Konzentration und der Struktur der untersuchten Verbindung abhängig. Mit zunehmender Länge der Alkylkette stieg die Potenz der Verbindungen die  $[Ca^{2+}]_i$  zu erhöhen. Für die Toxizität der Verbindungen gilt eine ähnliche Beziehung zwischen Struktur und Wirkung, allerdings konnte durch die Einbeziehung weiterer Verbindungen nachgewiesen werden, daß mit dem Überschreiten einer optimal wirksamen Alkylkettenlänge die Toxizität bei einer weiteren Verlängerung der Seitenketten wieder abnimmt. Mit parabolischen QSAR Modellen konnte dies eindrucksvoll nachgewiesen werden, wobei als molekulare Parameter das ionische Molekulargewicht oder die Oberfläche gegen die  $LC_{50}$  ( $\log \mu M$ ) aufgetragen wurde (Ade *et al.*, 1996). Dies ist auf die amphipatische Natur der Organometalle zurückzuführen. Die hydrophoben Alkylseitenketten begünstigen die unspezifischen Wechselwirkungen mit den Lipiden der Plasmamembran, die zur An- und Einlagerung oder zur Aufnahme der Xenobiotika führen können. Diese These belegen Untersuchungen der Ultrastruktur von Membranen, in denen nach der Behandlung mit Tributylzinn Aggregate der Verbindung nachgewiesen wurden (Porvaznik *et al.*, 1986; Gray *et al.*, 1987). Der polare Teil des Moleküls, das zentrale Metallatom, vermittelt wahrscheinlich die spezifischen Wechselwirkungen mit Enzymen oder Ionenkanälen. In diesem Zusammenhang wird diskutiert,

daß Thiolgruppen mit den Zentralatomen der Verbindungen reagieren können (Zimmermann *et al.*, 1988; Chow & Orrenius, 1994). Zusätzlich ist die dreidimensionale Struktur der Organometalle wichtig für hochspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen, denn die Organometalle binden nur an bestimmte Proteine mit hoher Affinität. So konnte bei verschiedenen getesteten Spezies nur für Katzen- und Rattenhämoglobin hohe Bindungsstärken zu TBT nachgewiesen werden. Die Affinität für Tributylzinn sank jedoch nach der Desoxygenierung, die mit einer Konformationsänderung verbunden ist, stark ab. Dies ist ein Befund der für sterische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Zinnverbindung spricht (Siebenlist & Taketa, 1986).

Bei den neuronalen NG108-15 Zellen induzierten Triethylblei und Triethylzinn ebenfalls eine persistente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Im Untersuchungszeitraum konnten weder Calciumoszillationen noch Calciumwellen nachgewiesen werden (Abb. 26 + 27). Diese zeitlich und räumlich hochorganisierten Signale waren nur nach einer Stimulierung mit Bradykinin nachzuweisen. Bei den NG108-15 Zellen konnten aus technischen Gründen (die Ergebnisse konnten nicht quantifiziert werden) keine Dosiseffekte untersucht werden. Um die Wirkungsmechanismen der Organometalle untersuchen zu können, wurden deshalb Konzentrationen ausgewählt, die zu einem deutlichen Effekt führten.

Normalerweise wird die  $[Ca^{2+}]_i$  von den Zellen auf extrem niedrigem Niveau gehalten und auf physiologische Stimuli reagieren beide Zelltypen, wie in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, mit einer transienten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Wirkung der Organometalle unterscheidet sich somit deutlich von den transienten Signalen, die von Rezeptoragonisten induziert werden. Die persistente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  ist sicher für das toxische Potential der untersuchten Substanzen mit verantwortlich. Sie ist ein unphysiologischer und einschneidender Vorgang für die Zellen, da an die  $[Ca^{2+}]_i$  eine Vielzahl von Regulationsmechanismen gekoppelt sind. Beim Absterben der Zellen werden calciumabhängige Proteasen, Endonucleasen und Phospholipasen aktiviert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch calciumantagonistische Substanzen der Zelltod verzögert werden kann (Abb. 15 + 16).

### **Mechanistische Untersuchungen zu den Effekten der Organometalle**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen, die zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beitragen, aufzuklären. Grundsätzlich könnte der beobachtete Effekt der Organometalle auf Wechselwirkungen mit Rezeptoren von Hormonen bzw. Wachstumsfaktoren oder mit G-Proteinen zurückzuführen sein, die zu einer Aktivierung der PLC und zur Bildung von  $IP_3$  führen. Aber auch Proteine, die den Calciumgradienten an den Membranen (ER, Mitochondrien, Plasmamembran) aufrechterhalten, wie die  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher und die  $Ca^{2+}$ -ATPasen, sowie die  $Ca^{2+}$ -Kanäle, könnten direkt oder indirekt durch die Organometalle verändert werden und ebenso wie ein Energiedefizit die Veränderungen der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren. Schließlich könnten auch unspezifische Membranschäden zu einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beitragen.

Letztgenannte scheiden aus mehreren Gründen mit großer Wahrscheinlichkeit als Ursache für den Organometalleffekt aus. Der Calciumindikator Fluo-3, ein kleines Molekül, wird in den Zellen zurückgehalten und gelangt nicht in den extrazellulären Raum (Abb. 6). In einem chloridfreien Medium ist der Effekt von TEL und TML auf die  $[Ca^{2+}]_i$  aufgehoben (Tab. 7), der Calciumgradient an der Plasmamembran kann demnach aufrechterhalten werden. Dies wäre nicht der Fall, wenn diese Verbindungen Löcher in der Membran verursachen würden. Schließlich konnte auch mit dem Trypanblau-Test gezeigt werden, daß die Integrität der Zellmembran im Untersuchungszeitraum gewahrt bleibt.

### **Der organometall-induzierte Calciuminflux ins Zytosol: Untersuchungen zur Quelle des Calciums**

Grundsätzlich gibt es zwei Quellen aus denen Calcium in das Zytosol strömen kann, wenn die Zellen mit einem physiologischen Stimulus aktiviert werden. Zum einen kann Calcium aus dem extrazellulären Raum einströmen und zum anderen kann es aus den intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Beide Pools können mit Hilfe des chemotaktischen Peptids fMLP dargestellt werden (Abb. 5). In einem calciumhaltigen Medium trägt sowohl extrazelluläres wie auch intrazelluläres Calcium zum Signal bei, während die Stimulierung in einem calciumfreien Medium den Anteil der intrazellulären Speicher am Signal verdeutlicht. Im Gegensatz zu fMLP konnten

---

die Organometalle in calciumfreiem Medium weder bei den neuronalen NG108-15 Zellen (Abb. 28 + 29) noch bei den HL-60 Zellen eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren (Abb. 7, 8, 9 + 10; Tab. 2 + 3). Weitere Versuche, die jedoch nur mit den HL-60 Zellen durchgeführt wurden, bestätigten, daß der intrazelluläre Calciumpool unverändert bleibt (Abb. 9 + 10). In diesen Experimenten wurden die intrazellulären Speicher im Anschluß an die Behandlung mit den Organometallen durch die Applikation von Calciumionophor entleert (Calciumionophor interkaliert in die Membranen der zellulären Organellen, so daß Calcium entlang dem Konzentrationsgradienten ins Zytosol strömt). In parallelen Ansätzen wurden die intrazellulären Speicher von Kontrollzellen und von mit Thapsigargin (Thapsigargin ist ein spezifischer Inhibitor der  $Ca^{2+}$ -ATPasen des ER) vorbehandelten Zellen durch die Applikation von Calciumionophor entleert. In den Kontrollen und den Zellen, die mit Organometallen vorbehandelt worden waren, konnten durch Calciumionophor gleiche Mengen Calcium freigesetzt werden, während die mit Thapsigargin vorinkubierten Zellen deutlich weniger Calcium aus den Speichern entlassen konnten. Die Speicher der mit Thapsigargin vorbehandelten Zellen hatten durch die Hemmung der  $Ca^{2+}$ -ATPasen deutlich Calcium aus dem ER verloren. In den HL-60 Zellen die mit Organometallen exponiert waren, war dies nicht der Fall. Dies bedeutet, daß in diesen Zellen die  $Ca^{2+}$ -ATPasen des ER nicht gehemmt und die Entleerung der intrazellulären Speicher nicht von den Organometallen induziert wurde.

Dieses Ergebnis wurde durch weitere Versuche, mit Zellen die im Anschluß an die Organometallbehandlung mit fMLP stimuliert wurden, untermauert. Das chemotaktische Peptid bewirkte eine transiente Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 19). Im Gegensatz dazu konnte Montero und Kollegen (1994) mit fMLP eine transiente Erniedrigung der  $[Ca^{2+}]_i$  induzieren, nachdem die intrazellulären Speicher durch die Behandlung mit Thapsigargin entleert worden waren. Bei diesen Experimenten bewirkt Thapsigargin die Öffnung von Calciumkanälen der Plasmamembran wie sie im kapazitiven Modell postuliert wird (Putney, 1986). Dadurch steigt die  $[Ca^{2+}]_i$  an und das chemotaktische Peptid bewirkt dann eine transiente Erniedrigung des  $[Ca^{2+}]_i$ , da es die  $Ca^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran aktiviert und den Calciumeinstroms durch Kanäle hemmt. Wenn die Organometalle ebenfalls die intrazellulären Speicher entleeren würden, wäre von fMLP ein ähnlicher Effekt zu erwarten.

Von widersprüchlichen Ergebnissen berichten andere Arbeitsgruppen, die feststellten, daß TBT Calcium aus intrazellulären Speichern von Thymozyten freisetzen kann (Chow *et al.*, 1992; Oyama *et al.*, 1994). Weiter wurde festgestellt, daß TBT, TET und TMT die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des SR (Kodavanti *et al.*, 1991) und TEL die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des ER hemmen kann (Albano *et al.*, 1994). Mit TBT, TET und TMT konnten die ATPasen von Synaptosomen gehemmt werden (Yallapragada *et al.*, 1990). Die Effekte der Organometalle sind also vom untersuchten Zelltyp abhängig.

### **Organometalle und die Energiereserven der Zellen**

Zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen der Organometalle fanden die Mitochondrien besondere Beachtung, da sie wichtig für die Energiegewinnung der Zellen sind. Es wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, daß die Zinnverbindungen die Atmungskettenphosphorylierung hemmen und zu einem Energieverlust in den Zellen führen. Nach der Behandlung mit TBT sank die ATP-Konzentration in Thymozyten innerhalb von 15 Minuten auf 50 % und nach 4 Stunden auf 18 % der ATP-Konzentration von Kontrollen (Raffray *et al.*, 1993). Snoeij und seine Mitarbeiter (1986) berichten von einem Rückgang der ATP-Konzentration um 40 %, nachdem Thymozyten für 1 Stunde mit TBT inkubiert worden waren. Weitere Effekte von TEL und TET, die bei Untersuchungen von Synaptosomen festgestellt wurden, sind neben der Verminderung der ATP-Konzentration und der Entkopplung der Atmungskette die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials (Kauppinen *et al.*, 1988). Die Entkopplung der Atmungskette durch die Organometalle war aber nur partiell, der Großteil des Protonengradienten blieb noch bestehen und brach erst zusammen, als die Synaptosomen mit einem protonentransportierenden Antibiotikum behandelt wurden. Isolierte Rattenhepatozyten reagierten 5 min nach der Applikation von TEL mit einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials (Albano *et al.*, 1994). Die Toxine zeigen also Wirkungen, die zur Einschränkung essentieller Zellfunktionen führen können. Unter anderem könnte auch eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aus einem Energiedefizit resultieren, da die Aufrechterhaltung der Calciumgradienten energieabhängig ist. Daher war eine wichtige Frage, die beantwortet werden sollte, ob die Organometalle auch bei HL-60 Zellen die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöhen, nachdem sie ein

Energiedefizit verursacht haben. Auf die Messung der ATP-Konzentration wurde verzichtet, nachdem mit anderen Versuchen deutlich gezeigt werden konnte, daß die Zellen noch Energiereserven besitzen. Die Ergebnisse (Abb. 9, 10 + 19) zeigen, daß die Zellen das Calcium in den intrazellulären Speichern zurückhalten können. Dafür ist Energie in Form von ATP erforderlich, denn Calcium diffundiert permanent aus dem ER und wird von den  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen zurückgepumpt. Diese Versuche, die allerdings, um die intrazellulären Speicher darstellen zu können, im calciumfreien Medium durchgeführt wurden, zeigten eindeutig, daß energieverbrauchende Prozesse noch ablaufen können, denn die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des ER führt in HL-60 und NG108-15 Zellen sofort zu einem Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Zytosol, wie mit Hilfe von Thapsigargin veranschaulicht werden konnte (Abb. 10 + 31). Dem Calciumzyklus an der Membran des ER werden physiologische Funktionen zugeschrieben und er soll durch die partielle Öffnung von Calciumkanälen durch  $\text{IP}_3$  zustande kommen (Favre *et al.*, 1994).

Bei den gerade besprochenen Versuchen ist zu beachten, daß kein Calciumgradient über der Plasmamembran vorhanden war, dessen Aufrechterhaltung ebenfalls Energie erfordert. Die Zellen wurden deshalb in calciumhaltigen Medium im Anschluß an die Behandlung mit den Organometallen mit fMLP stimuliert (Abb. 19), um weitere Hinweise auf ihren Energiestatus zu bekommen. Die Zellen können obwohl sie mit den Organometallen vorbehandelt waren, zunächst dem durch fMLP induzierten enormen Calciumeinstrom entgegenwirken. Erst nach einigen Minuten wird deutlich, daß die mit Organometallen behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nicht mehr so effektiv gegenregulieren können. Da diese Regulation, wie noch diskutiert werden muß, durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran erfolgt, ist offensichtlich auch nach der Organometallbehandlung noch für einige Minuten genügend chemische Energie zum Antrieb dieser Systeme in den Zellen vorhanden. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, daß die Organometalle die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  relativ schnell erhöhen, während die Veränderung des Energiestatus der Zellen bzw. die Schädigung der Mitochondrien einige Zeit in Anspruch nimmt, da die Organometalle zunächst die Plasmamembran durchdringen müssen. Erst dann können sie durch das Zytosol zu den Mitochondrien gelangen. Außerdem schalten die Zellen, wenn die Mitochondrien durch die Organometalle geschädigt werden, zur Energiegewinnung von der oxidativen auf die glykolytische Phosphorylierung um (Snoeij *et al.*,

1986). Für diesen Prozeß spricht auch die beobachtete Ansäuerung, die bei HL-60 Zellen durch die Organometalle verursacht wird. Ein weiteres Argument dafür, daß die Zellen noch Energiereserven besitzen, ist die Apoptose. Die Apoptose ist ein Vorgang der durch die Organometalle induziert werden kann, wenn sie in niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden. Sie kann nach 2-3 Stunden anhand einer charakteristischen DNA Leiter, die auf die Fragmentierung der DNA durch Endonucleasen zurückzuführen ist, bei HL-60 Zellen nachgewiesen werden (Zaucke *et al.*, 1995). Sie ist ein Vorgang, bei dem die Zellen noch metabolisch aktiv sind, denn apoptotische Zellen können z.B. Ionengradienten an der Membran aufrechterhalten (Barry *et al.*, 1993).

### **Der Effekt der Organometalle auf die $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen**

Wie schon erwähnt wurde, sind  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen Proteine, die in ihrer Funktion durch die Organometalle beeinträchtigt werden können. Über die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen bei HL-60 Zellen geben verschiedene Untersuchungen Aufschluß. Es handelt sich um die schon angesprochenen Versuche, bei denen in calciumfreiem Medium die intrazellulären Speicher mit Ionophor entleert wurden und bei denen die Zellen im Anschluß an die Behandlung mit den Organometallen mit fMLP stimuliert wurden. Bei diesen Experimenten konnten die Zellen, die mit Organometallen behandelt worden waren, dem Calciuminflux, der durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor bzw. fMLP induziert worden war, zunächst sehr gut entgegenwirken. Erst nach einigen Minuten konnten die behandelten Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen das Calcium nicht mehr so schnell in den extrazellulären Raum transportieren. Am Versuchsende war die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei den organometall-behandelten Zellen merklich höher. Am deutlichsten war dieser Effekt beim TET und beim TPT. Dieser Befund ist höchstwahrscheinlich auf die Hemmung bzw. auf eine Veränderung der Affinität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen zurückzuführen (Abb. 9 + 10). Dafür sprechen folgende Ergebnisse: wenn die HL-60 Zellen bei 4 °C mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor in calciumfreiem Medium behandelt wurden, konnte zunächst kein Rückgang der freien Calciumionen im Zytosol beobachtet werden. Es handelt sich demnach nicht um einen Diffusionsprozeß, sondern um einen Transportmechanismus wie z.B. einen Ionenaustauscher (Antiport). Die in Frage kommenden  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher scheinen, wie die Experimente mit Amilorid (Abb. 10)

zeigen, aber nicht beteiligt zu sein. Die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher sind offensichtlich auch bei der Rückregulation der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach einem Rezeptorstimulus bei HL-60 Zellen nicht involviert, denn die Zellen können unabhängig davon, ob Natrium im Medium vorhanden ist oder nicht, die ursprüngliche  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wieder einstellen (Abb. 20). Diese Charakteristika der HL-60 Zellen konnten für weitere Versuche ausgenutzt werden.

Während die Organometalle nicht in allen Zelltypen zu einer Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führen, sind im Bezug auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran vergleichbare Wirkungen bei verschiedenen untersuchten Zelltypen nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den dialkylierten Verbindungen, haben trialkylierte Zinnverbindungen keine hohe Affinität zu Thiolgruppen (Boyer, 1989). Dennoch wurde die Schutzwirkung von reduzierenden Substanzen wie Dithiothreitol beschrieben (Chow & Orrenius, 1994; Zaucke, persönliche Mitteilung). Diese einfachen oxidativen Prozesse dürften aber kaum der molekulare Wirkungsmechanismus der Organometalle sein, denn sie binden nur an wenige Proteine mit hoher Affinität. Dies läßt darauf schließen, daß die Organometalle nicht allein mit einer Aminosäure interagieren, sondern daß spezifische dreidimensionale Strukturen die Stärke der Bindung bestimmen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen könnten ein solches organometall-bindendes Protein sein. Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen zu beeinflussen, müssen die Organometalle nicht unbedingt direkt an die ATPasen binden. Denkbar wäre auch eine Interaktion mit dem Regulatorprotein Calmodulin. Calmodulin ist ein ubiquitäres Protein, das ausschließlich die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran reguliert (Penniston & Enyedi, 1994). Es konnte nachgewiesen werden, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, nachdem sie durch Calmodulin aktiviert wurden, viel stärker durch TBT, TET und TMT hemmbar sind (Yallapragada *et al.* 1990). Da auch die durch Calmodulin aktivierte Phosphodiesterase stärker durch TBT und TET gehemmt war, könnten die Organometalle auch an Calmodulin binden und dadurch die Wirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen übertragen.

Die Organometalle könnten die Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen verhindern oder die ATPasen hemmen, indem sie die Lipidumgebung verändern, wenn sie in die Plasmamembran interkalieren (Penniston & Enyedi, 1994). Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen obligatorisch zwei Protonen ins Zytosol transportieren (Carafoli, 1992), kann die von den Organometallen induzierte Ansäuerung dem

Calciumtransport entgegenwirken. Die organometall-induzierte Ansäuerung könnte natürlich auch auf die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen zurückzuführen sein.

Für die neuronalen Zellen liegen keine entsprechenden Untersuchungen vor, da sie sich für die Messung im Fluoreszenzspektrometer nicht eignen. Durch die Differenzierung bilden die Zellen keine geschlossene Einzelzellschicht (Abb. 4), so daß das Fluoreszenzsignal zu schwach ist um vom Meßgerät detektiert werden zu können.

### Die Komponenten der Calcium-Signalwege

Die membranassoziierten Signaltransduktionselemente generieren die Calciumsignale im Zytosol. Sie sind ebenfalls potentielle Angriffspunkte der Organometalle. HL-60 Zellen exprimieren G-protein-gekoppelte Rezeptoren, welche die PLC  $\beta$  aktivieren und Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, welche die PLC  $\gamma$  aktivieren. Die Aktivierung der PLC führt zu einem charakteristischen Calciumeinstrom ins Zytosol, der sich aus den intrazellulären und den extrazellulären Calciumanteilen zusammensetzt. Während die G-protein-gekoppelten fMLP-Rezeptoren bei HL-60 Zellen pertussistoxin-sensitiv sind (Abb. 5), sind die Effekte von ATP auf der G-Proteinebene nur partiell durch Pertussistoxin hemmbar (Cockcroft & Thomas, 1992). Neben diesen Signaltransduktionswegen gibt es auch Rezeptoren, die G-protein-abhängig die Leitfähigkeit für Calcium in der Plasmamembran erhöhen und die intrazellulären Calciumspeicher unverändert lassen (Seifert *et al.*, 1994). Die Phospholipasen des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Typs werden durch eine Phosphorylierung gehemmt, die von der PKC katalysiert wird. Diese Phosphorylierung kann durch die Aktivierung der PKC mit TPA ausgelöst werden (Thompson *et al.*, 1986; Cockcroft & Thomas, 1992).

Obwohl die Beteiligung einer  $\text{IP}_3$  vermittelten Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , beim organometall-induzierten Effekt unwahrscheinlich erschien, da kein Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, die diesen Befund untermauern sollten. Daß Toxine die Signaltransduktion stören können, ist z.B. für Pertussistoxin aber auch für Metalle wie  $\text{Al}^{3+}$  (McDonald & Mamrack, 1988) und Organometalle wie das Methylquecksilber (Sarafian, 1993) nachgewiesen worden. Pertussistoxin inaktiviert hochspezifisch die Signaltransduktion durch bestimmte G-Proteine. Es eignet sich besonders gut, um diese

Mechanismen zu untersuchen. Hinweise auf die Beteiligung der an G-Proteine gekoppelten Signalweiterleitung gab es von Untersuchungen der organometall-induzierten Arachidonsäurefreisetzung. Die Vorbehandlung mit Pertussistoxin hatte zu einer partiellen Hemmung des Organometalleffekts geführt (Käfer & Krug, 1994; Krug, 1995). Auf die organometall-induzierte Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  hatte die Vorbehandlung mit TPA bzw. Pertussistoxin im Gegensatz zu den Kontrollversuchen mit fMLP (Abb. 12) keinen Einfluß (Abb. 13, Tab. 4). Die Vorbehandlung mit TPA ging sogar immer mit einer Verstärkung des Metalleffektes einher. Die  $Ca^{2+}$ -ATPasen (Perianin & Snyderman, 1989; Penniston & Enyedi, 1994) und die  $Na^+/H^+$ -Austauscher (Ladoux *et al.*, 1987) werden durch die PKC phosphoryliert und aktiviert, deshalb könnte durch die Phosphorylierung die Affinität der  $Ca^{2+}$ -ATPasen für die Organometalle gesteigert und dadurch die inhibitorische Wirkung der Organometalle verstärkt werden. Auch die Aktivierung der  $Na^+/H^+$ -Austauscher kann indirekt durch den Abbau des  $Na^+$ -Gradienten, der sich negativ auf die  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher auswirkt, den beobachteten Effekt erklären helfen. TPA induziert durch die Auslösung des *respiratory burst*, eine transiente Ansäuerung des Zytosols, die von den Zellen durch die Aktivität der  $Na^+/H^+$ -Austauscher einreguliert wird (Ladoux *et al.*, 1989). Zusätzlich induzieren die Organometalle eine weitere Ansäuerung im Zytosol. Als Folge von beiden parallel ablaufenden Prozessen könnte die Konkurrenz der Protonen mit Calcium um Bindungsstellen an Proteinen den Effekt der Organometalle verstärken. Nach diesen Befunden ist es unwahrscheinlich, daß die Organometalle in bestimmte G-protein-gesteuerte und PLC-abhängige Signalwege aktivierend eingreifen.

### Die Calciumkanäle der Plasmamembran

Neben den  $Ca^{2+}$ -ATPasen sind die Calciumkanäle die wichtigsten Membranproteine, die im Zusammenhang mit der Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  eine Rolle spielen. Die beiden Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, unterscheiden sich sehr stark bezüglich der Ausstattung mit Calciumkanälen. Die neuronalen NG108-15 Zellen exprimieren neben den rezeptorabhängigen und durch *second messenger* gesteuerten Calciumkanälen noch unterschiedliche spannungsabhängige Calciumkanäle. Durch große Depolarisationen der Membran werden Kanäle vom L-, Q-, P- und N-Typ, durch kleine Depolarisationen werden Kanäle vom T-Typ-geöffnet.

Bei NG108-15 Zellen wurden Kanäle vom L-Typ und N-Typ nachgewiesen (Kasai & Neher, 1992; Chueh *et al.*, 1994). Diese Kanäle sind durchlässig für  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  und sind durch  $Gd^{2+}$ ,  $La^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Ni^{2+}$  blockierbar (Kasai & Neher, 1992). Im Gegensatz dazu wurden spannungsabhängige Calciumkanäle beschrieben, die für  $Mn^{2+}$  durchlässig sein sollen (Ogura *et al.*, 1990). Daneben gibt es die rezeptor-aktivierten Calciumkanäle der intrazellulären Speicher und der Plasmamembran, die sich in den NG-Zellen nach Stimulierung mit Hormonen wie z.B. Bradykinin öffnen (Ogura *et al.*, 1990, Wilk-Blaszczak *et al.*, 1994). In HL-60 Zellen konnten keine spannungsabhängigen Calciumkanäle nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß es in diesen nichterregbaren Zellen nur rezeptorgesteuerte oder durch *second messenger* gesteuerte Calciumkanäle gibt (Krause *et al.*, 1990; Tsunoda, 1993). Diese Kanäle sind neben  $Ca^{2+}$  für  $Mn^{2+}$  durchlässig und können durch  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  und  $La^{3+}$  blockiert werden (Demaurex *et al.*, 1992). Bei Neutrophilen wurden auch calciumaktivierte Calciumkanäle beschrieben (Scharff & Foder, 1993). HL-60 Zellen sollen diese Kanäle allerdings nicht besitzen. Bei ihnen wird angenommen, daß ein erhöhter Calciumspiegel die Bildung von  $IP_3$  durch die PLC fördert, wodurch der Calciumeinstrom ins Zytosol verstärkt wird (Pittet *et al.*, 1989). Insgesamt sind die Calciumkanäle der HL-60 Zellen, wie auch die von anderen nicht erregbaren Zellen, nicht sehr gut charakterisiert. Dies dürfte vor allem daran liegen, daß die nichterregbaren Zellen die  $[Ca^{2+}]_i$  nur sehr langsam erhöhen, wofür nur sehr kleine Ströme nötig sind. Dadurch werden die Kanäle nur schwer detektierbar. Während ein Aktionspotential im Bereich von Millisekunden abläuft und nur unter Beteiligung von großen Calciumströmen entstehen kann, dauert ein typisches Calciumsignal in HL-60 Zellen mehrere Minuten. Die molekulare Struktur der Calciumkanäle von Blutzellen ist noch völlig unbekannt (Scharff & Foder, 1993). Es ist daher nicht möglich durch Aufreinigung und Rekonstitution der Proteine in Membranen ihre Eigenschaften zu untersuchen.

Die Untersuchungen mit dem Calciumkanalblocker  $Ni^{2+}$  ergaben in HL-60 Zellen weitere Hinweise auf den organometall-induzierten Mechanismus der Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die Wirkung der untersuchten Bleiverbindungen konnte durch die Vorinkubation mit  $Ni^{2+}$  deutlich gehemmt werden (Abb. 15 + 16, Tab. 5), während im Fall der Zinnverbindungen nur der Effekt von TBT deutlich vermindert war. In weiteren Untersuchungen, die nur mit TEL durchgeführt wurden, konnte die  $[Ca^{2+}]_i$ , die nach der 10 minütigen Behandlung mit TEL gestiegen war, durch die

Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$  ins Inkubationmedium von den Zellen deutlich gesenkt werden (Daten nicht gezeigt). Weitere Experimente mit  $\text{Mn}^{2+}$  (Abb. 17 + 18), geben einen mehr als deutlichen Hinweis auf den Wirkungsmechanismus der Bleiverbindungen und von TBT. Diese Verbindungen induzieren die Öffnung von Calciumkanälen der Plasmamembran. Erstaunlicherweise konnte dies weder für TPT noch für TET nachgewiesen werden.

Wie die Organometalle die Öffnung der Calciumkanäle induzieren, ist bislang noch unbekannt. Die Aktivierung des  $\text{IP}_3$  Signalweges ist aber sehr unwahrscheinlich: weder mit Pertussistoxin noch mit TPA konnte der Organometalleffekt negativ beeinflusst werden, und es war auch keine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern detektierbar. Denkbar wäre aber noch die Beteiligung von anderen Signalwegen. Wird z.B. der Signaltransduktionsweg des Tumornekrosefaktors (TNF) aktiviert, wird auch freie Arachidonsäure gebildet (Raines *et al.*, 1994; Vandenabeele *et al.*, 1995). Arachidonsäure kann in HL-60 Zellen einen Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum induzieren (Abb. 11). Da auch die Organometalle die Bildung von Arachidonsäure bewirken könnte sie die Öffnung von Calciumkanälen induzieren. Kinetische Untersuchungen zur Arachidonsäurefreisetzung durch die Organometalle haben allerdings gezeigt, daß die  $\text{cPLA}_2$  erst dann aktiv wird, wenn die Calciumkonzentration einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat (Krug & Culig, 1991; Ade *et al.*, 1995). Außerdem ließ sich mit Verapamil (in erregbaren Zellen ein Inhibitor von spannungsabhängigen Calciumkanälen) die Arachidonsäurefreisetzung um bis zu 70 % hemmen (Käfer & Krug, 1994), während der Calciumeinstrom unverändert bleibt (Daten nicht gezeigt), da die HL-60 Zellen keine spannungsabhängigen Calciumkanäle besitzen. Die Wirkung von Verapamil auf die organometall-induzierte Arachidonsäurefreisetzung in HL-60 Zellen ist wahrscheinlich dadurch begründet, daß Verapamil unspezifische Komplexe mit Phospholipiden bildet, die das Substrat, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, für die  $\text{cPLA}_2$  unzugänglich machen (Chang *et al.*, 1987). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die freie Arachidonsäure erst dann gebildet wird wenn die  $\text{cPLA}_2$  durch den organometall-induzierten Calciumeinstrom ins Zytosol aktiviert wurde und nicht umgekehrt, daß die Arachidonsäure den Influx von Calcium aktiviert. Die Arachidonsäure und ihre Metabolite, oder andere Calcium aktivierende Substanzen, könnten aber nach längeren Inkubationszeiten, vor allem mit TBT, zu einem Calciumeinstrom ins Zytosol führen

(Abb. 23). Wie noch besprochen wird, verursachen die Organometalle Störungen des Chlorid- und Protonenhaushalts. Diese Störungen könnten durch die Veränderung des osmotischen Drucks im Zytosol einen Wassereinstrom und dadurch ein Anschwellen der Zellen bewirken. Die daraus resultierende Dehnung der Plasmamembran kann die Calciumkanäle von Neutrophilen aktivieren (Krause & Welsh, 1990).

Bei den NG108-15 Zellen konnte für TEL und TBT ebenfalls eine Beteiligung der Calciumkanäle nachgewiesen werden. Mit Verapamil, einem Blocker von spannungsabhängigen Calciumkanälen (die unspezifischen Wirkungen von Verapamil sind im Zusammenhang mit den Calciumkanälen bedeutungslos), konnte der Effekt von TBT sehr stark vermindert werden (Abb. 32). Auch  $Mn^{2+}$ , das sowohl als Blocker von spannungsabhängigen Calciumkanälen wirkt, aber auch durch rezeptorgesteuerte Kanäle in die Zellen gelangen kann, vermindert innerhalb kurzer Zeit die Fluoreszenz des calciumsensitiven Farbstoffs in den NG-Zellen und belegt damit die Beteiligung von Calciumkanälen am Organometalleffekt (Abb. 26 + 27).

### **Die $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher**

Neben den  $Ca^{2+}$ -ATPasen sind die  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher für die Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  von Bedeutung. Sie finden sich in der Plasmamembran genauso wie in der Mitochondrienmembran und der Membran des SR von Herz- und Skelettmuskelzellen, von neuronalen Zellen wie z.B. den NG108-15 Zellen und verschiedenen sekretorischen Zellen. Sie transportieren normalerweise Calcium im obligatorischen Austausch gegen Natrium über die Membran in den extrazellulären Raum. Die  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher sollen nach der Meinung von Carafoli (1987) nur bei starken Erhöhungen der  $[Ca^{2+}]_i$  und vor allem in erregbaren Zellen eine Rolle spielen, da sie im Gegensatz zu den  $Ca^{2+}$ -ATPasen nur eine geringe Affinität, aber eine große Transportkapazität für Calcium besitzen. Dennoch können die Austauscher durch den ungefähr 10fachen Natriumgradienten an der Plasmamembran und das Membranpotential die  $[Ca^{2+}]_i$  theoretisch auf 30-40 nM reduzieren (Reeves, 1992). Die Austauscher sind nicht elektroneutral, da sie drei Natriumionen gegen ein Calciumion austauschen. Deshalb wird der Natriumefflux und der Calciuminflux gefördert, wenn die Membran depolarisiert wird und umgekehrt, wenn die Membran repolarisiert. Die Umkehrung der Transportrichtung, d.h. der Austausch von  $Ca^{2+}$  ins

Zytosol und  $\text{Na}^+$  in den extrazellulären Raum, kann aber nicht nur durch die Depolarisation, sondern auch nach der Veränderung des Natriumgradienten erfolgen und damit die Ursache für die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sein (Hideharu *et al.*, 1994; Kiedrowski *et al.*, 1994). Die Umkehrung könnte demnach auch durch Organometalle induziert werden, denn sie bewirken eine Ansäuerung des Zytosols, die zum einen zusammen mit dem Calciumeinstrom die Membran depolarisieren und zum anderen durch die Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers den Natriumgradienten umkehren könnte.

In Blutzellen, insbesondere in Neutrophilen, ist die Existenz der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher umstritten (Scharff & Foder, 1993). Zusätzlich ist unklar, ob sie für den Calciuminflux oder den -efflux wichtig sind. Es wurde zum einen berichtet, daß die Austauscher Calcium nach außen transportieren, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen gehemmt sind, während sie beim fMLP-induzierten Calciumeinstrom unwichtig sind (Aviram & Aviram, 1989). Zum anderen wurde gezeigt, daß die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher erheblich zur Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  beitragen, wenn Neutrophile mit fMLP stimuliert werden (Simchowitz *et al.*, 1990).

Aus zwei Gründen gab es Anlaß zu der Annahme, daß die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher an den Effekten der Organometalle auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in HL-60 Zellen beteiligt sein könnten. Erstens wird die Umkehrung der Transportrichtung als Ursache der von TEL induzierten Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in primären Hepatozyten diskutiert (Carini *et al.*, 1994). Zweitens war nach der Vorinkubation der Zellen mit Amilorid und nachfolgender Behandlung mit den Organometallen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen, eine Verstärkung der von Organobleiverbindungen induzierten Arachidonsäurefreisetzung festgestellt worden (Käfer, 1994). Da Amilorid ein bekannter Inhibitor der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ist, wurde dieser Effekt auf einen verminderten Abtransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den Zellen zurückgeführt. Wie die Experimente mit Amilorid zeigten, war die Ursache für die verstärkte Arachidonsäurefreisetzung wahrscheinlich eine unspezifische Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  durch Amilorid, die zur weiteren Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> führte (Daten nicht gezeigt). Amilorid induziert einen Calciuminflux aus dem extrazellulären Raum, da in calciumfreiem Medium die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  unverändert bleibt (Abb. 10 b). Die Hemmung der Austauscher mit Amilorid konnte durch die unspezifische Nebenwirkung von Amilorid in calciumhaltigen Medium keinen Aufschluß auf die Wirkung der Organometalle geben. Diese

Befunde waren ausschlaggebend, um die Wirkung der Organometalle in einem Medium, dessen Natriumionen durch Cholin substituiert worden waren, zu untersuchen. Natriumfreie Medien wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher eingesetzt (Ladoux *et al.*, 1987, Kiedrowski *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). Das natriumfreie Medium induziert im Gegensatz zu Amilorid *per se* keine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Durch diesen Befund ist auch ausgeschlossen, daß die verminderte Natriumkonzentration die Bildung von  $\text{IP}_3$  induziert, wie sie in renalen Epithelzellen festgestellt wurde (Smith *et al.*, 1989; Brochiero *et al.*, 1995). Im unstimulierten Zustand sind die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher ohne Bedeutung für die Aufrechterhaltung des basalen Calciumspiegels (Abb. 10). Wenn die Zellen allerdings in natriumfreiem Medium mit den Organometallen behandelt wurden, konnte mit TEL, TML und mit TBT eine deutliche Verstärkung und mit TPL eine leichte Verstärkung des Effekts im Vergleich zum natriumhaltigen Medium festgestellt werden, während die Behandlung mit TPT und TET keine unterschiedlichen Ergebnisse brachte (Tab. 6). Diese beiden Verbindungen, die keine Öffnung von Calciumkanälen induzierten, unterscheiden sich also auch durch diesen Befund von den anderen Substanzen.

Um die beobachteten Effekte zu erklären, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zunächst soll der Effekt unter der Annahme diskutiert werden, daß die HL-60 Zellen die  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher besitzen. Die Wirkung der Bleiverbindungen und von TBT auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in natriumfreiem Medium kann durch zwei Mechanismen erklärt werden. Zum einen könnten die Austauscher im natriumfreien Medium im Gegensatz zum natriumhaltigen Medium umgekehrt arbeiten. Da im Zytosol mehr Natrium vorhanden ist als im extrazellulären Raum, transportieren sie Natrium nach außen und Calcium nach innen. Hierdurch wird der Effekt der Xenobiotika verstärkt. Die Umkehrung des Transports wird durch die Depolarisation der Membran und den veränderten Natriumgradienten unterstützt. Zum anderen könnten die Austauscher auch aufgrund des fehlenden Natriumgradienten nicht mehr funktionieren und somit nicht zum Abtransport von Calcium aus dem Zytosol beitragen. Beide Erklärungen sprechen dafür, daß die Austauscher durch die Bleiverbindungen und durch TBT nicht beeinträchtigt werden. Die Wirkung von TET und TPT auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ist in natriumfreiem Medium im Vergleich zum natriumhaltigen Medium unverändert. Diese Ergebnisse sind nur dadurch zu erklären, daß die Austauscher von TET und

TPT gehemmt werden. Dies könnte auch beim TPhL der Fall sein, da der Effekt im natriumfreien Medium zwar signifikant, aber im Vergleich zum TEL nur sehr schwach verändert ist.

Nun werden die Ergebnisse unter der Annahme diskutiert, daß die HL-60 Zellen keine  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher besitzen. Die Organometalle induzieren eine Ansäuerung des Zytosols (Abb. 21). Dieser Ansäuerung wirken die HL-60 Zellen normalerweise durch die Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher entgegen [die  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher sollen in den HL-60 Zellen nicht wichtig zur Regulation des pH-Wertes sein. Sie werden nur aktiviert, wenn das Zytosol alkalisch wird (Ladoux *et al.*, 1987)]. Wenn der Natriumgradient nicht mehr vorhanden ist, können die Austauscher nicht mehr arbeiten, und die Ansäuerung des Zytosols wird verstärkt. Die Protonen können dann mit Calcium um Bindungsstellen an negativ geladenen Gruppen konkurrieren und Calcium verdrängen, wodurch die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ansteigt. Allerdings müßten dann für TET und TPT zusätzliche oder andere Mechanismen angenommen werden, da auch diese Verbindungen die Ansäuerung im Zytosol bewirken.

Als weitere Ursache für die Verstärkung des Organometalleffekts durch natriumfreies Medium, kommt die bereits erwähnte, von den Bleiverbindungen und TBT induzierte Öffnung von Calciumkanälen in Frage. Die Calciumkanäle von HL-60 Zellen sollen auch für Natriumionen durchlässig sein (Krautwurst *et al.*, 1992). Wenn Natrium im extrazellulären Medium fehlt, kann es auch nicht mehr mit Calcium um den Durchtritt durch den Kanal konkurrieren und letztlich gelangt dadurch mehr Calcium ins Zytosol. Diese These korreliert auch sehr gut mit der Tatsache, daß die beiden Substanzen TET und TPT, deren Wirkung auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in natriumfreiem Medium unverändert ist, auch keine Öffnung von Calciumkanälen bewirken.

### **Untersuchungen zur Wirkung der Organometalle auf den zytosolischen pH-Wert**

In der Literatur werden als Folge der Ansäuerung des Zytosols je nach Zelltyp unterschiedliche Effekte beschrieben. So kann es zur Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern oder zum Calciumeinstrom durch pH-sensitive Calciumkanäle kommen (Burns *et al.*, 1991, Tsunoda, 1993). In HL-60 Zellen bewirkt die Ansäuerung des Zytosols mittels Propionsäure eine Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Naccache *et al.*, 1988). Es wurde postuliert, daß durch die Ansäuerung ein Calciuminflux ausgelöst wird, der zur Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher führt

(Burns *et al.*, 1991). Von den Zinn- und Bleiverbindungen ist schon lange bekannt, daß sie OH<sup>-</sup>-Ionen im Austausch gegen Cl<sup>-</sup>-Ionen durch Membranen transportieren können (siehe Kap. 1.4). Die treibende Kraft ist der Konzentrationsgradient der Cl<sup>-</sup>-Ionen an der Plasmamembran (Simchowit *et al.*, 1991). Somit werden Cl<sup>-</sup>-Ionen in die Zellen und OH<sup>-</sup>-Ionen aus den Zellen transportiert, der pH-Wert im Zytosol sinkt und die Chloridkonzentration in den Zellen nimmt zu. Protonengradienten sind vor allem an der inneren Mitochondrienmembran wichtig zur Bildung von ATP und die Protonengradienten werden durch den Ionenaustausch der Organometalle abgebaut (Kauppinen *et al.*, 1988). Allerdings wirkt die Ansäuerung des Zytosols, die zum Aufbau eines Protonengradienten an der Plasmamembran führt, dem Austausch entgegen und bringt ihn zum Erliegen (Simchowit *et al.*, 1991).

Durch die Ansäuerung kann es zur Konkurrenz von Protonen und Calcium um negativ geladene Gruppen an Makromolekülen und Lipiden kommen. Dieser Konkurrenz wird die transiente Ansäuerung zugeschrieben, die durch eine Stimulierung mit fMLP in HL-60 Zellen induziert wird (Ladoux *et al.*, 1989). Der Ansäuerung wirken HL-60 Zellen normalerweise durch die Aktivierung der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher entgegen (Restrepo *et al.*, 1987; Ladoux *et al.*, 1989). Die Aktivität dieser Austauscher kann die Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher beeinträchtigen, da der Natriumgradient an der Membran abgebaut wird. In anderen Zellen werden Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher aktiviert, die in HL-60 Zellen bisher aber nicht nachgewiesen worden sind (Tsukamoto *et al.*, 1991, Daugirdas *et al.*, 1995).

Um die Auswirkungen des in der Literatur beschriebenen, durch die Organometalle bedingten Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup>-Austausches auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> untersuchen zu können, wurde ein chloridfreies Medium hergestellt. Behandelt man die HL-60 Zellen in diesem Medium, führt dies mit allen Verbindungen mit Ausnahme von TPhL zu einer statistisch signifikanten Verringerung des Organometalleffekts auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Tab. 7). Bei Behandlung mit TEL und TML führt die Verwendung eines chloridfreien Mediums zur fast 100 %igen Hemmung. Die Effekte dieser beiden Substanzen sind also sehr stark von Chloridionen abhängig. Von Bedeutung könnte in diesem Zusammenhang die Umkehrung des Chloridgradienten im chloridfreien Medium sein. Die Organometalle könnten unter diesen Bedingungen Chlorid nach außen und Hydroxidionen nach innen transportieren.

Bei den anderen untersuchten Verbindungen könnten andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen, denn die Chloridkonzentration im Außenmedium beeinflusst hormonstimulierte Calciumströme. Bei Endothelzellen führt die Öffnung von  $\text{Cl}^-$ -Kanälen zur Hyperpolarisation der Membran und damit zur Verstärkung des Calciumstroms (Yumoto *et al.*, 1995). Da  $\text{Cl}^-$ -Kanäle auch in HL-60 Zellen beschrieben wurden (Hallows & Knauf, 1994), könnten Chloridströme die Stärke von Calciumströmen beeinflussen. Der Effekt der Zinnverbindungen in chloridfreiem Medium könnte auch dadurch vermindert werden, daß das Membranpotential durch die Ansäuerung und den Calciumeinstrom depolarisiert wird, sind keine Chloridionen zum Ladungsausgleich vorhanden, wird der Calciumeinstrom durch die sinkende elektromotorische Kraft abgeschwächt. Für TEL und TML kommt dieser Effekt aber nicht in Frage, da der Calciumeinstrom sehr stark gehemmt wird und auch die Ansäuerung nur schwach (TEL) bzw. nicht (TML) nachweisbar war. Nach Behandlung mit diesen beiden Verbindungen scheint der  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$  Austausch, der durch die Substanzen selbst katalysiert wird, von großer Bedeutung und eventuell der auslösende Faktor für den Effekt auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zu sein.

Diese Versuche deuteten darauf hin, daß die Organometalle auch in HL-60 Zellen wie in der Literatur beschrieben als Ionenaustauscher wirken. Theoretisch wäre es deshalb möglich, daß die aus dem Ionenaustausch resultierende Ansäuerung im Zytosol die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  z. B. durch die Aktivierung von pH-sensitiven Calciumkanälen, induziert. Deshalb war es unumgänglich, die Wirkung der Organometalle auf den intrazellulären pH-Wert zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die Bestimmung des pH-Werts mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF etabliert. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, daß die Organometalle eine Senkung des pH-Werts im Zytosol verursachen (Abb. 21). Die Zinnverbindungen und TPhL verursachten die pH-Änderung sehr schnell. Bereits nach der 2 min war das Maximum erreicht und pendelte sich dann um diesen Wert ein. Ein von TBT induzierter schneller Chloridinflux, der im Zusammenhang mit dem  $\text{Cl}^-/\text{OH}^-$ -Austausch stehend nach kurzer Zeit ein Plateau erreichte, wurde auch von Simchowitz und Kollegen (1991) in Neutrophilen nachgewiesen. Die beiden trialkylierten Bleiverbindungen führten erst nach 5 min zur maximalen Ansäuerung des Zytosols. Sie unterscheiden sich dadurch erneut deutlich von den anderen untersuchten Substanzen.

Weitere Unterschiede ergaben sich in der Wirksamkeit der Substanzen. Denn die Verbindungen, die wie TBT, TET und TPhL in relativ niedrigen Konzentrationen eingesetzt wurden, senkten den pH-Wert um ca. 0,13 - 0,18 Einheiten, während die Erniedrigung durch die anderen untersuchten Verbindungen, die in höheren Konzentrationen eingesetzt wurden, ca. 0,2 - 0,25 pH-Einheiten betrug.

Die Erhöhung der zytosolischen Protonenkonzentration, die von den Organometallen verursacht wird, könnte zur Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beitragen, da Protonen mit Calcium um Bindungsstellen konkurrieren können. Diese Ansäuerung ist aber nicht der Faktor, der die Öffnung von pH-sensitiven Calciumkanälen auslöst, denn TET und TPT senken den pH-Wert ebenfalls, bewirken aber nicht die Öffnung von Calciumkanälen. Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß eine intrazelluläre Ansäuerung in HL-60 Zellen nicht mit einer Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  einhergehen muß (Barry *et al.*, 1993).

Die Untersuchungen der Effekte auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in chloridfreiem Medium zeigten, daß sich die Kanäle nicht durch eine direkte Interaktion mit TEL und TML öffnen, es sei denn, diese Wechselwirkungen wären in Abwesenheit von Chloridionen verhindert. Der Effekt von TEL und TML ist demzufolge stark von der Anwesenheit von Chloridionen abhängig. Toxische Effekte, die von Veränderungen der Chloridionenkonzentration im Zytosol ausgehen, wurden auch in Nervenzellen nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß die Depolarisation der Membran durch Glutamat zu einem Chlorideinstrom führt, der das Anschwellen der Zellen bewirkt. Dieses Anschwellen soll der auslösende Faktor sein, der zum Absterben der Zellen führt. Allerdings sterben die Zellen nicht dadurch, daß sie durch den erhöhten Innendruck platzen, sondern durch andere Faktoren, die durch den gestörten Ionenhaushalt entstehen (Takahashi *et al.*, 1995). Demnach könnte auch die Wirkung der trialkylierten Bleiverbindungen auf die  $[Ca^{2+}]_i$  auf eine veränderte Chloridkonzentration im Zytosol zurückzuführen sein, denn die Volumenregulation von Zellen ist von Chloridionen abhängig. Allerdings muß der im chloridfreien Medium fehlende Effekt von TML und TEL auf die  $[Ca^{2+}]_i$  nicht unbedingt mit einer verminderten Toxizität der Verbindungen einhergehen. Verity und Kollegen (1990) stellten im chloridfreien Medium im Vergleich zum chloridhaltigen Medium ein schnelleres Absterben von Nervenzellen fest.

In chloridfreiem Medium waren die Metalleffekte auf den zytosolischen pH-Wert sehr unterschiedlich (Abb. 22). Erst 5 min nach der Applikation der Zinnverbindungen, TEL und TPhL war der Effekt feststellbar. Außerdem war die durch TPT, TET, TEL hervorgerufene Wirkung nicht so stark. Die Behandlung mit TML führte in chloridfreiem Medium zu keiner Ansäuerung. Der schwächere Effekt dieser Verbindungen ist sicher auf die Umkehrung des Chloridgradienten zurückzuführen. Unter chloridfreien Bedingungen im extrazellulären Raum können die Organometalle keine Hydroxidionen aus den Zellen transportieren, sondern es werden entsprechend dem Chloridgradienten Hydroxidionen in die Zellen transportiert. Dieser Transport wirkt der Ansäuerung des Zytosols entgegen.

Die Effekte waren nach der Behandlung mit TBT und TPhL unabhängig von Chloridionen. Ihre Wirkung war im chloridhaltigen genauso wie im chloridfreien Medium (Tab. 8). Die Ansäuerung fand also unabhängig von Chlorid statt und wird durch diese Verbindungen wahrscheinlich als Folge verschiedener Zellaktivitäten hervorgerufen. Als Reaktion auf TBT und TPhL könnten die Zellen zur Energiegewinnung den Metabolismus erhöhen, insbesondere die Aktivierung der Glykolyse, kann innerhalb von Sekunden zur Ansäuerung des Zytosols führen (Borregaad *et al.*, 1984). Die Aktivierung der Glykolyse nach der Behandlung mit Organometallen wurde bereits nachgewiesen (Snoeij *et al.*, 1986). Die Ansäuerung könnte auch auf den *respiratory burst*, der durch die Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration gesteuert wird, zurückzuführen sein (Simchowitz *et al.*, 1990; Krautwurst *et al.*, 1992). Auch die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, die als Austauschionen Protonen benötigt, könnte den beobachteten Effekt erklären (Carafoli, 1992; Daugirdas *et al.*, 1995). Diese Effekte könnten die Wirkung der beiden Substanzen als Ionenaustauscher überdecken. Für TET, TPT und TEL waren im chloridfreiem Medium nur in den ersten 5 min unterschiedliche Effekte im Vergleich zum chloridhaltigen Medium festzustellen (Tab. 8). Diese sind dadurch zu erklären, daß die Organometalle, in Anwesenheit von Chloridionen, den schnellen chloridabhängigen Hydroxidionen-Austausch bewirken. Wenn keine Chloridionen vorhanden sind, kehrt sich dieser Effekt um und wirkt der Ansäuerung entgegen, die durch dieselben Faktoren induziert werden kann und für TBT und TPhL diskutiert wurden. Im chloridhaltigen Medium wirken beide Effekte zusammen. Chlorid, das aus den Zellen ins Medium diffundiert und das mit den Organometallen ins Medium gelangt, (da sie als Chloridsalze zugesetzt

werden) kann den Austausch nicht bewirken, da er gegen einen Chloridgradienten erfolgen müßte. Im Gegensatz dazu ist die Ansäuerung durch TML auf seine Aktivität als Ionentauscher zurückzuführen.

### **Folgereaktionen der Erhöhung der zytosolischen freien Calciumkonzentration**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen Zusammenhang zwischen den beiden Organometalleffekten Arachidonsäurefreisetzung und Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ , herzustellen. Die Freisetzung der Arachidonsäure ist aus folgenden Gründen auf die Aktivierung der calciumabhängigen cPLA<sub>2</sub> zurückzuführen: I. Die Arachidonsäurefreisetzung ist durch Inhibitoren der cPLA<sub>2</sub> hemmbar (Krug & Culig, 1991). II. Die Arachidonsäure wird aus der *sn*-2 Position von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin, den Substraten der cPLA<sub>2</sub> freigesetzt (Krug & Culig, 1991; Käfer *et al.*, 1992). III. Es konnte nachgewiesen werden, daß nur Arachidonsäure und keine andere Fettsäure freigesetzt wird (Krug & Culig, 1991). IV. Die Arachidonsäurefreisetzung erfolgt nur, wenn ausreichend Calcium vorhanden ist. Die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> erfolgt, wenn das Enzym aufgrund der erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  an die Plasmamembran verlagert wird (Channon & Leslie, 1990; Clark *et al.*, 1991; Rehfeldt *et al.*, 1993) und wenn eine Phosphorylierung erfolgt (Dennis, 1993; Lin *et al.*, 1993). Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, daß die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch die Organometalle der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub> vorausgeht. Diese These wird durch folgende Ergebnisse gestützt: I. Auch das Ca<sup>2+</sup>-Ionophor A23187 führt zur Arachidonsäurefreisetzung aus den Membranphospholipiden von HL-60 Zellen (Käfer *et al.*, 1992). II. Dieselben Konzentrationen der Organometalle, welche die Freisetzung von Arachidonsäure stimulieren, erhöhen auch die  $[Ca^{2+}]_i$  (Abb. 15 + 16) III. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, daß Arachidonsäure erst einigen Minuten nach der Zugabe von Organometallen freigesetzt wird (Krug & Culig, 1991), zu diesem Zeitpunkt ist die  $[Ca^{2+}]_i$  bereits auf Werte von 100-200 nM angestiegen (Abb. 15 + 16). IV. In calciumfreiem Medium wird keine Arachidonsäure freigesetzt (Abb. 15 + 16). V. Die Reduktion des Calciumeinstroms durch Ni<sup>2+</sup> und in chloridfreiem Medium geht mit einer Reduktion der Arachidonsäurefreisetzung einher (Abb. 15 + 16, Tab. 9).

Die unterschiedliche Wirkung der Organometalle auf die Arachidonsäurefreisetzung wirft die Frage nach zusätzlichen Mechanismen der cPLA<sub>2</sub> Aktivierung auf. In diesem Zusammenhang dürfte die Phosphorylierung ein wichtiger Punkt sein. Die Aktivierung der MAP-Kinase, einem Enzym, das in der Signaltransduktionskaskade die Phosphorylierung der cPLA<sub>2</sub> katalysieren kann, wurde für TBT und TEL nachgewiesen (Zaucke, persönliche Mitteilung).

Aus der Arachidonsäure werden von den HL-60 Zellen und im menschlichen Organismus von den Neutrophilen zahlreiche Metabolite gebildet, wie Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene und Lipoxine. Diese Metabolite der Arachidonsäure und der plättchenaktivierende Faktor (PAF) sind wichtige Mediatoren von Entzündungen, sie sind an der Immunantwort und an Überempfindlichkeitsreaktionen beteiligt. Durch diese Mediatoren werden andere Blutzellen aktiviert. In Thrombozyten wird durch Arachidonsäure die PLC aktiviert und durch Thromboxan A<sub>2</sub> wird die Aggregation ausgelöst. Durch PAF werden z.B. Thrombozyten, Makrophagen und Eosinophile aktiviert, nachdem PAF an einen Membranrezeptor gebunden und die Stimulierung der PLC bewirkt hat (Barnes *et al.*, 1988). Da HL-60 Zellen nach der Behandlung mit Organometallen Arachidonsäure freisetzen, PAF bilden (Krug *et al.*, 1994) und die freie Arachidonsäure metabolisieren, und eventuell noch weitere bisher nicht beschriebene Signalstoffe entstehen könnten, wurde untersucht, ob solche aktivierenden Substanzen von den HL-60 Zellen abgegeben werden. Nach der Behandlung von Zellen mit TBT konnten nach ca. 10 min Faktoren, die einen Calciuminflux ins Zytosol von unbehandelten Zellen auslösen, nachgewiesen werden (Abb. 23), während mit TEL kein Effekt festgestellt werden konnte. Um welche Art von Faktoren es sich handeln könnte, ist bisher noch unklar.

In nahezu umweltrelevanten Konzentrationen können Organometalle, wenn sie gleichzeitig mit anderen Verbindungen, wie z.B. Lebensmittelfarbstoffen eingesetzt werden, ebenfalls die Freisetzung von Arachidonsäure induzieren (Walser & Krug, 1995). Weitere Effekte, die durch niedrige Organometallkonzentrationen hervorgerufen werden, sind Veränderungen des Zytoskeletts und der Zelloberfläche (Krug *et al.*, 1993), der Genexpression (Käfer, 1994) und die Induktion der Apoptose (Zaucke *et al.*, 1995). Die Struktur des Zytoskeletts ist von der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> abhängig, z.B. monomerisieren bei hohen Calciumkonzentrationen die Aktinfilamente (Matsudira & Janmey, 1988). Die Induktion des jun-Onkogens, z.B. durch TEL (Käfer, 1994), steht unter

Kontrolle der intrazellulären freien Calciumkonzentration (Werlen *et al.*, 1993) und wird in der Literatur als allgemeine Reaktion auf Zellschädigungen, die von Xenobiotika ausgehen, sowie im Zusammenhang mit der Apoptose diskutiert (Collota *et al.*, 1992; Ham *et al.*, 1995). An der Apoptose sind calciumabhängige Endonucleasen beteiligt. Weiterhin spielen die  $[Ca^{2+}]_i$ , sowie der intrazelluläre pH-Wert eine wichtige Rolle (Schwartzman & Cidlowski, 1993; Raffray *et al.*, 1993; Binder & Hiddemann, 1994). Das Interesse an der Beeinflussung der genannten Prozesse durch Calcium war und ist daher sehr groß. Deshalb wurden Untersuchungen mit niedrigen Organometallkonzentrationen und längeren Inkubationszeiten durchgeführt. Auch mit den niedrigen Toxinkonzentrationen konnte nach einer Behandlung von 60 min eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  erreicht werden (Tab. 10). Dadurch entsteht der Eindruck, daß ein Zusammenhang zwischen der Apoptose und der durch die Organometalle induzierten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  besteht. Es gibt aber einige Arbeiten, in denen nachgewiesen wurde, daß die Apoptose auch unabhängig von einer Calciumerhöhung ablaufen kann und z.B. von einer Ansäuerung des Zytosols abhängig ist (Barry & Eastman, 1992; Eastman, 1995). Diese wurde durch die Organometalle ebenfalls verursacht (Abb. 21). Die Apoptose ist durch den Ablauf von komplexen Vorgängen charakterisiert, die auch durch die Organometalle ausgelöst werden und den Zelluntergang herbeiführen. Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, daß TBT in Thymozyten die Apoptose bewirken kann (Aw *et al.*, 1990). Mit diesen Ergebnissen lassen sich z.B. *in vivo* Befunde, wie die Atrophie des Thymus von Ratten, erklären (Boyer, 1989; Vos *et al.*, 1989). Die Beeinträchtigung des Immunsystems durch Organometalle kann ernste Folgen für die Gesundheit haben. Schwere Unfälle wie z.B. Ende der 70er Jahre im Irak, wo mit Quecksilberverbindungen gebeiztes Saatgut zum Brotbacken verwendet wurde, haben das toxische Potential und die Wirkung der Metallverbindungen deutlich gemacht. Gefahren für die Gesundheit gehen aber nicht nur von Unfällen aus, denn inzwischen erreichen die Organometalle durch ihren Eintrag in die Umwelt stellenweise sehr hohe Konzentrationen und durch deren Akkumulation im Körper können bestimmte Organe in Mitleidenschaft gezogen werden. Im Knochengewebe von Robben und Walen der Nordsee wurden Bleiwerte festgestellt, die beim Menschen Knochengewebsnekrosen auslösen können. Die Methylquecksilberwerte waren weit

---

höher, als alle bisher in der Welt gemessenen Werte und stellen damit eine potentielle Gefahrenquelle für die Blut- und Immunzellbildung dar (Beyer, 1995).

Neben dem Immunsystem wird auch das Nervensystem von den Organometallen geschädigt. Die Minamata-Katastrophe wurde durch die Einleitung von quecksilberhaltigen Fabrikabwässern ins Meer ausgelöst. Die Bevölkerung wurde durch kontaminierten Fisch mit Methylquecksilber belastet und es zeigte sich, daß die pränatale Exposition mit Methylquecksilber zu zerebralen Störungen führt. Auch die chronische, subletale Verabreichung von TEL führte im Tierversuch zu einem Verlust von Neuronen im Hippocampus (Verity, 1995). In Ratten wurde durch injiziertes TMT die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen im Hippocampus induziert (LeBel *et al.*, 1990). Die Organometalle verursachen die Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren (Glutamat und Aspartat), die durch andauernde Erregung den massenhaften Tod von Nervenzellen bewirken können (Vos *et al.*, 1989). Der Untergang von Nervenzellen bzw. morphologische Veränderungen, wie sie durch die Behandlung von Nervenzellen mit Organometallen gezeigt wurden (Audesirk *et al.*, 1989), werden im direkten Zusammenhang mit der Alzheimer und Huntington Krankheit diskutiert (Irvin *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1994).

Bislang gibt es aufgrund fehlender Daten noch keine generelle Hypothese zum Mechanismus der immuno- und neurotoxischen Wirkung der Organometalle. Die in dieser Arbeit an Zellkulturen gewonnenen Daten leisten einen Beitrag um den Zusammenhang zwischen dem durch die Organometalle induzierten molekularen und zellulären Veränderungen und den *in vivo* festgestellten pathologischen Befunden, herzustellen.

---

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die zellulären Wirkungsmechanismen organischer Blei- und Zinnverbindungen sind zum großen Teil nicht verstanden. Die immuno- und neurotoxischen Effekte dieser Xenobiotika lassen jedoch die Beeinflussung der Signalwege in den Zellen vermuten. Daher lag der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung der Signalübertragungswege und der damit verbundenen Regulation des Calciums.

Sowohl in den immunkompetenten Zellen (HL-60) wie auch in den neuronalen Zellen (NG108-15) induzierten die untersuchten Organometalle eine persistente Erhöhung der zytosolischen freien Calciumkonzentration.

Mechanistische Studien mit EGTA, dem Calciumkanalblocker Nickel und der Untersuchung der intrazellulären Speicher in den HL-60 Zellen ergaben, daß ausschließlich das extrazelluläre Calcium für den organometall-induzierten Anstieg der zytosolischen freien Calciumkonzentration verantwortlich ist. Die Bleiverbindungen sowie das TBT führen zur Öffnung von Calciumkanälen in der Plasmamembran, dem die HL-60 Zellen nicht mehr ausreichend entgegenwirken können.

Die Experimente mit den NG108-15 Zellen belegen diese Ergebnisse. Durch den Einsatz von Mangan ( $Mn^{2+}$ ) und Verapamil wurde nachgewiesen, daß der von TEL und TBT induzierte Calciuminflux auch hier durch Calciumkanäle erfolgt.

Während bestimmte rezeptor-aktivierte Signalwege durch die Organometalle nicht induziert werden, konnte die Hemmung von  $Ca^{2+}$ -ATPasen ebenfalls beschrieben werden.

Die von ihrer Struktur abhängige Wirkung der Blei- und Zinnverbindungen resultiert letztlich in durch das Calcium vermittelten Folgereaktionen, wie der Aktivierung der  $cPLA_2$  oder eventuell der Induktion der Apoptose.

Die durch die Metallverbindungen veränderte Regulation der zytosolischen freien Calciumkonzentration war auch von anderen Ionengradienten an der Plasmamembran, wie  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , oder  $H^+$  abhängig.

Mit dieser Arbeit wurde ein Beitrag zur Aufklärung der biochemischen Mechanismen und zum Verständnis der zellschädigenden Wirkung von Organometallen geleistet.

---

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ade T., Zaucke F. & Krug H.F. (1995).** Organometals induce distinct changes in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  followed by arachidonic acid liberation via  $\text{PLA}_2$  activation. *Mol. Pharmacol.*, eingereicht.
- Ade T., Zaucke F. & Krug H.F. (1996).** The structure of organometals determines cytotoxicity and alteration of calcium homeostasis in HL-60 cells. *Fres. J. Anal. Chem.*, im Druck.
- Albano E., Bellomo G., Benedetti A., Carini R., Fulceri R., Gamberucci A., Parola M. & Comporti M. (1994).** Alterations of hepatocyte  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by triethyllead: are they correlated with cytotoxicity? *Chem.-Biol. Interact.*, 90, 59-72.
- Aldridge W.N. (1976).** The influence of organotin compounds on mitochondrial functions. In: *Organotin compounds: New chemistry and applications*, (Zuckerman J.J., ed.). American Chemical Society, Washington DC, 189-196.
- Ali A.A., Upreti R.K. & Kidwai A.M. (1987).** Interaction of di- and tributyltin chloride with human erythrocyte membrane. *Toxicol. Lett.*, 38, 13-18.
- Audesirk G., Shugarts D., Nelson G. & Przekwas J. (1989).** Organic and inorganic lead inhibit neurite growth in vertebrate and invertebrate neurons in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25, 1121-1128.
- Aviram A. & Aviram I. (1989).** Stimulation of polymorphonuclear leukocytes by dicyclohexylcarbodiimide: calcium homeostasis. *Cell Calcium*, 10, 115-124.
- Aw T.Y., Nicotera P., Manzo L. & Orrenius S. (1990).** Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283, 46-50.
- Barnes P.J., Chung K.F. & Page C.P. (1988).** Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 81, 919-934.
- Barry M.A. & Eastman A. (1992).** Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and pH. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 186, 782-789.
- Barry M.A., Reynolds J.E. & Eastman A. (1993).** Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.*, 53, 2349-2357.
- Berridge M.J. (1993).** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361, 315-325.
- Berridge M.J. & Dupont G. (1994).** Spatial and temporal signalling by calcium. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 267-274.
- Beyer N. (1995).** Blei in den Knochen. *Bild d. Wissenschaft.* 11, 128-129.
- Binder C. & Hiddemann W. (1994).** Programmed cell death - many questions still to be answered. *Ann. Hematol.*, 69, 45-55.
- Bligh E.G. & Dyer W.J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Blunden S.J. & Chapman A. (1986).** Organotin compounds in the environment. In: *Organometallic compounds in the environment*, (Craig P.J., ed.). John Wiley & Sons, New York, 111-159.
- Boobis A.R., Fawthrop D.J. & Davies D.S. (1989).** Mechanisms of cell death. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 275-280.
- Borregaard N., Schwarz J.H. & Tauber A.I. (1984).** Proton secretion by stimulated neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 74, 455-459.
- Boyer I.J. (1989).** Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, 55, 253-298.

- Brochiero E., Raschi C. & Ehrenfeld (1995).** Na/Ca exchange in the basolateral membrane of the A6 cell monolayer: role in Ca homeostasis. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.*, 430, 105-114.
- Burch R.M. (1989).** G Protein regulation of phospholipase A<sub>2</sub>. *Mol. Neurobiol.*, 3, 155-171.
- Burns K.D., Homma T., Breyer M.D. & Harris R.C. (1991).** Cytosolic acidification stimulates a calcium influx that activates Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in LLC-PK<sub>1</sub>. *Am. J. Physiol.*, 261, F617-F625.
- Carafoli E. (1987).** Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 395-433.
- Carafoli E. (1992).** The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 267, 2115-2118.
- Carini R., Bellomo G., Dianzani M.U. & Albano E. (1994).** Evidence for a sodium-dependent calcium influx in isolated rat hepatocytes undergoing ATP depletion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 202, 360-366.
- Catterall W.A. (1994).** Molecular properties of a superfamily of plasma-membrane cation channels. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 607-615.
- Chang J., Musser J.H. & McGregor H. (1987).** Phospholipase A<sub>2</sub>: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 36, 2429-2436.
- Channon J.Y. & Leslie C.C. (1990).** A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonyl-hydrolyzing PLA<sub>2</sub> with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J. Biol. Chem.*, 265, 5409-5413.
- Chau Y.K., Wong P.T., Bengert G.A. & Dunn J.L. (1984).** Determination of dialkyllead, trialkyllead, tetraalkyllead, and lead(II) compounds in sediment and biological samples. *Anal. Chem.*, 56, 271-274.
- Chau Y.K., Wong P.T., Bengert G.A. & Wasslen J. (1988).** Bioaccumulation of alkyllead compounds from water and from contaminated sediments by mussels. *Appl. Organomet. Chem.*, 2, 427-433.
- Chow S.C., Kass G.E., McCabe M.J. & Orrenius S. (1992).** Tributyltin increases cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca<sup>2+</sup>, activating a Ca<sup>2+</sup> entry pathway, and inhibiting Ca<sup>2+</sup> efflux. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 143-149.
- Chow S.C. & Orrenius S. (1994).** Rapid cytoskeleton modification in thymocytes induced by the immuno toxicant tributyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 127, 19-26.
- Chueh S-H., Kao L-S. & Liu Y-T. (1994).** Enhanced calcium signalling events in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells after treatment with dibutyryl cyclic AMP. *Brain Res.*, 660, 81-87.
- Clapham D.E. (1995).** Calcium signaling. *Cell*, 80, 259-268.
- Clark J.D., Lin L.L., Kriz R.W., Ramesha C.S., Sultzman L.A., Lin A.Y., Milona N. & Knopf J.L. (1991).** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA<sub>2</sub> contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65, 1043-1051.
- Cockcroft S. & Thomas G.M. (1992).** Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem. J.*, 288, 1-14.
- Collins S.J., Gallo R.C. & Gallagher R.E. (1977).** Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, 270, 347-349.
- Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E. & Gallo R.C. (1978).** Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 2458-2462.
- Colotta F., Polentarutti N., Sironi M. & Mantovani A. (1992).** Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.*, 267, 18278-18283.

- Corcoran G.B. & Ray S.D. (1992).** Contemporary issues in toxicology. The role of the nucleus and other compartments in toxic cell death produced by alkylating hepatotoxicants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113, 167-183.
- Daugirdas J.T., Arrieta J., Ye M., Flores G. & Batlle D.C. (1995).** Intracellular acidification associated with changes in free cytosolic calcium. *J. Clin. Invest.*, 1480-1489.
- Daudeker M. (1990).** III. Toxikologische Einzelstoffinformation, Zinn. In: *Handbuch der Umweltgifte: Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis*, (Daudeker M., ed.), ecomed Verlag, Landsberg/Lech, Band II, 1-20.
- Demaurex N., Lew D.P. & Krause K.H. (1992).** Cyclopiazonic acid depletes intracellular  $Ca^{2+}$  stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 2318-2324.
- Dennis E.A. (1994).** Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase  $A_2$ . *J. Biol. Chem.*, 269, 13057-13060.
- Dieterich H. (1992).** Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration bei HL-60 Zellen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Durstin M., Durstin S., Molski T.F., Becker E.L. & Sha'afi R.I. (1994).** Cytoplasmic phospholipase  $A_2$  translocates to membrane fraction in human neutrophils activated by stimuli that phosphorylate mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3142-3146.
- Eastman A. (1995).** Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis. *Cancer Biol.*, 6, 45-52.
- Fascolato C., Innocenti B. & Pozzan T. (1994).** Receptor-activated  $Ca^{2+}$  influx: how many mechanisms for how many channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15, 77-83.
- Favre C., Lew D. & Krause K. (1994).** Rapid heparin-sensitive  $Ca^{2+}$  release following  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibition in intact HL-60 granulocytes. *Biochem. J.*, 302, 155-162.
- Forsyth D.S., Weber D. & Cleroux C. (1992).** Determination of butyltin, cyclohexyltin and phenyltin compounds in beers and wines. *Food Additives Contam.*, 9, 161-169.
- Froissart P., Unligil P., Aubry H. & Proulx P. (1989).** Modulation by phorbol 12-myristate 13-acetate of arachidonic acid release from rat basophilic leukemia cells stimulated with A 23187. *Biochim. Biophys. Acta*, 1002, 376-381.
- Ghahary A. & Cheng K.W. (1989).** Characterization of muscarinic acetylcholine receptors on intact neuroblastoma x glioma NG108-15 cells upon differentiation. *Mol. Cell. Biochem.*, 86, 181-188.
- Grandjean P. (1983).** Health significance of organolead compounds. In: *Lead versus health*, (Rutter M. & Jones R.R., eds.). John Wiley & Sons, London, 179-189.
- Gray B.H., Porvaznik M., Flemming C. & Lee L.H. (1987).** Organotin-induced hemolysis, shape transformation and intramembraneous aggregates in human erythrocytes. *Cell Biol. Toxicol.*, 3, 23-38.
- Hallows K.R. & Knauf P.A. (1994).** Regulatory volume decrease in HL-60 cells: importance of rapid changes in permeability of  $Cl^-$  and organic solutes. *Am. J. Physiol.*, 267, C1045-C1056.
- Ham J., Babij C., Whitfield J., Pfarr C.M., Lallemand D., Yaniv M. & Rubin L.L. (1995).** A c-Jun dominant negativ mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron*, 14, 927-939.
- Hamprecht B. (1974).** Cell cultures as model systems for studying the biochemistry of differentiated functions of nerve cells. *Colloq. Ges. Biol. Chem.*, 25, 391-423.

- Hamprecht B., Glaser T., Reiser G., Bayer E. & Propst F. (1985).** Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma x glioma hybrid cells. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 109, Hormone Action Part 1: Peptide Hormones, (Birnbaumer L. & O'Malley B.M., eds.). Academic Press, New York, 316-341.
- Haug A., Shi B. & Vitorello V. (1994).** Aluminium interaction with phosphoinositide-associated signal transduction. *Arch. Toxicol.*, 68, 1-7.
- Hideharu H., Satho H., Noda N., Terada H., Hirano M., Kobayashi A. & Yamazaki N. (1994).** Simultaneous measurement of intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> during K<sup>+</sup>-free perfusion in isolated myocytes. *Am. J. Physiol.*, 266, C416-C422.
- Henschler D. (1991).** Occupational Toxicants. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Commission of the investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area, Vol. 1, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 315-333.
- Hirner A.V., Feldmann J., Goguel R., Rapsomanikis S., Fischer R. & Andrease M.O. (1994).** Volatile metal and metalloid species in gases from municipal waste deposits. *Appl. Organomet. Chem.*, 8, 65-69.
- Irwin R.P., Lin S-Z., Long R.T. & Paul S.M. (1994).** N-methyl-D-aspartate induces a rapid, reversible, and calcium-dependent intracellular acidosis in cultured fetal rat hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 14, 1352-1357.
- Käfer A. (1994).** In vitro-Untersuchungen zum Einfluß toxischer schwermetallorganischer Verbindungen auf zellulärer Ebene. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Käfer A. & Krug H.F. (1994).** Effects of organometals on cellular signalling: I. Influence of metabolic inhibitors on metal-induced arachidonic acid liberation. *Environ. Health Persp.*, 102, 325-330.
- Käfer A., Krug H.F. & Zöltzer H. (1992).** The stimulation of arachidonic acid metabolism by organic lead and tin compounds in human HL-60 leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 116, 125-132.
- Kao J.P., Harootunian A.T. & Tsien R.Y. (1989).** Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J. Biol. Chem.*, 264, 8179-8184.
- Kasai H. & Neher, E. (1992).** Dihydropyridine-sensitive and conotoxin-sensitive calcium channels in a mammalian neuroblastoma-glioma cell line. *J. Physiol.*, 448, 161-188.
- Kauppinen R.A., Komulainen H. & Taipale H.T. (1988).** Chloride-dependent uncoupling of oxidative phosphorylation by triethyllead and triethyltin increases cytosolic free calcium in guinea pig cerebral cortical synaptosomes. *J. Neurochem.*, 51, 1617-1625.
- Kiedrowski L., Brooker G., Costa E. & Wroblewski J.T. (1994).** Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron*, 12, 295-300.
- Kodavanti P.R., Cameron J.A., Yallapragada P.R., Vig P.J. & Desai D. (1991).** Inhibition of Ca<sup>2+</sup> transport associated with cAMP-dependent protein phosphorylation in rat cardiac sarcoplasmic reticulum by triorganotins. *Arch. Toxicol.*, 65, 311-317.
- Komulainen H. & Bondy S.C. (1987).** Increased free intrasynaptosomal Ca<sup>2+</sup> by neurotoxic organometals: distinctive mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 88, 77-86.
- Krajnc E.I., Wester P.W., Loeber J.G., van Leeuwen F.X., Vos J.G., Vaessen H.A. & van der Heijden C.A. (1984).** Toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide in the rat. I. Short-term effects on general parameters and on the endocrine and lymphoid systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 75, 363-368.
- Krause K.H., Campbell K.P., Welsh M.J. & Lew D.P. (1990).** The calcium signal and neutrophil activation. *Clin. Biochem.*, 23, 159-166.

- Krause K.H., Pittet D., Volpe P., Pozzan T., Meldolesi J. & Lew D.P. (1989).** Calciosome, a sarcoplasmic reticulum-like organelle involved in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -handling by non-muscle cells: studies in human neutrophils and HL-60 cells. *Cell Calcium*, 10, 351-361.
- Krause K.H. & Welsh M.J. (1990).** Voltage-dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ion channels in human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 85, 491-498.
- Krautwurst D., Seifert R., Hescheler J. & Schultz G. (1992).** Formyl peptides and ATP stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  inward currents through non-selective cation channels via G-proteins in dibutyryl cyclic AMP-differentiated HL-60 cells. *Biochem. J.*, 288, 1025-1035.
- Krug H.F. (1992).** The toxic effects of organometals on the Lands cycle in HL-60 cells. *Appl. Organomet. Chem.*, 6, 297-304.
- Krug H.F. (1995).** Stimulation of phospholipase  $\text{A}_2$  by toxic main group heavy metals: partly dependent on G-proteins? *Metal-Based Drugs*, 2, 91-98.
- Krug H.F. & Berndt J. (1987).** Stimulation of arachidonic acid metabolism via phospholipase  $\text{A}_2$  by triethyl lead. *Eur. J. Biochem.*, 162, 293-298.
- Krug H.F. & Culig H. (1991).** Directed shift of fatty acids from phospholipids to triacylglycerols in HL-60 cells induced by nanomolar concentrations of triethyl lead chloride: involvement of a pertussis toxin-sensitive pathway. *Mol. Pharmacol.*, 39, 511-516.
- Krug H.F., Käfer A. & Dieterich H. (1993).** The biochemical mechanisms of cellular toxicity of organolead and -tin compounds. In: *Frontiers of organogermanium, -tin and -lead chemistry*, (Lukevics E. & Ignatovich L., eds.). Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, 273-281.
- Krug H.F., Mattern D., Bidault J. & Ninio E. (1994).** Effects of organometals on cellular signaling: II. Inhibition of reincorporation of free arachidonic acid and influence on paf-acether synthesis by triethyllead. *Environ. Health Persp.*, 102, 331-334.
- Ladoux A., Cragoe E.J., Geny B., Abita J.P. & Frelin C. (1987).** Differentiation of human promyelocytic HL-60 cells by retinoic acid is accompanied by an increase in the intracellular pH. *J. Biol. Chem.*, 262, 811-816.
- Ladoux A., Krawiec I., Damais C. & Frelin C. (1989).** Phorbol esters and chemotactic factor induce distinct changes in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and pH in granulocytic like HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1013, 55-59.
- Lattanzio F.A. (1990).** The effects of pH and temperature on fluorescent calcium indicators as determined with Chelex-100 and EDTA buffer systems. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 171, 102-108.
- LeBel C.P., Ali S.F., McKee M. & Bondy S.C. (1990).** Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 104, 17-24.
- Lew P.D., Monod A., Krause K.H., Waldvogel F.A., Biden T.J. & Schlegel W. (1986).** The role of cytosolic free calcium in the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4-trisphosphate in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 13121-13127.
- Lin L.L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J.L., Seth A. & Davis R.J. (1993).** cPLA $_2$  is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*, 72, 269-278.
- Lobinski R., Szpunar-Lobinska J. & Adams F.C. (1993).** Speciation analysis of organolead compounds in wine by capillary gas chromatography/microwave-induced-plasma atomic emission spectrometry. *J. AOAC International*, 76, 1262-1267.

- MacKinnon R. (1995).** Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron*, 14, 889-892.
- Marinovich M., Sanghvi A., Colli S., Tremoli E. & Galli C.L. (1990).** Cytoskeletal modifications induced by organotin compounds in human neutrophils. *Toxicol. In Vitro*, 4, 109-113.
- Martin-Landa I., de Pablos F. & Marr I.L. (1989).** Determination of organotins in fish and sediments by gas chromatography with flame photometric detection. *Anal. Proc.*, 26, 16-18.
- Matsudaira P. & Janmey P. (1988).** Pieces in the actin-severing protein puzzle. *Cell*, 54, 139-140.
- McDonald L.J. & Mamrack M. D. (1988).** Aluminium affects phosphoinositide hydrolysis by phosphoinositidase C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 155, 203-208.
- Merritt J.E., McCarthy S.A., Davies M.P. & Moores K.E. (1990).** Use of fluo-3 to measure cytosolic  $Ca^{2+}$  in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic  $Ca^{2+}$ . *Biochem. J.*, 269, 513-519.
- Minta A., Kao J.P. & Tsien R.Y. (1989).** Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.*, 264, 8171-8178.
- Montero M., Garcia-Sancho J. & Alvarez J. (1994).** Transient inhibition by chemotactic peptide of a store-operated  $Ca^{2+}$  entry pathway in human neutrophils. *Biochem. J.*, 303, 559-566.
- Mosialou E. & Morgenstern R. (1989).** Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 275, 289-294.
- Mukherjee A.B., Miele L. & Pattabiramanz A. (1994).** Phospholipase  $A_2$  enzymes: regulation and physiological role. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1-10.
- Naccache P.H., Faucher N., Caon A.C. & McColl S.R. (1988).** Propionic acid-induced calcium mobilization in human neutrophils. *J. Cell. Physiol.*, 136, 118-124.
- Newburger P.E., Chovaniec M.E., Greenberger J.S. & Cohen H.J. (1979).** Functional changes in human leukemic cell line HL-60: a model for myeloid differentiation. *J. Cell Biol.*, 82, 315-322.
- Noronha-Blob L., Richard C. & D. U'Prichard D.C. (1988).** Voltage-sensitive calcium channels in differentiated neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) cells: characterization by quin 2 fluorescence. *J. Neurochem.*, 50, 1381-1390.
- Ogura A., Myojo Y. & Higashida H. (1990).** Bradykinin-evoked acetylcholine release via inositol trisphosphat-dependent elevation in free calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.*, 265, 3577-3584.
- Orrenius S., McConkey D.J., Bellomo G. & Nicotera P. (1989).** Role of  $Ca^{2+}$  in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 281-285.
- Oyama Y., Ueha T. & Hayashi (1993).** Effect of tri-*n*-butyltin on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of rat cerebellar neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 248, 89-93.
- Oyama Y., Ueha T., Hayashi A. & Chikahisa L. (1994).** Effect of tri-*n*-butyltin on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of mouse thymocytes under  $Ca^{2+}$ -free condition. *Eur. J. Pharmacol.*, 270, 137-142.
- Penniston J.T. & Enyedi A. (1994).** Plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump: recent developments. *Cell Physiol. Biochem.*, 4, 148-159.
- Perianin A. & Snyderman R. (1989).** Analysis of calcium homeostasis in activated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 264, 1005-1009.
- Pittet D., Lew D.P., Mayr G.W., Monod A. & Schlegel W. (1989).** Chemoattractant receptor promotion of  $Ca^{2+}$  influx across the plasma membrane of HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 264, 7251-7261.
-

- Porvaznik M.P., Gray B.H., Mattie D., Jackson A.G. & Omlor R.E. (1986).** The ultrastructural localization of tri-*n*-butyltin in human erythrocyte membranes during shape transformation leading to hemolysis. *Lab. Invest.*, 54, 254-267.
- Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P. & Meldolesi J. (1994).** Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.*, 74, 595-636.
- Putney J.W. (1986).** A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7, 1-12.
- Raffray M. & Cohen G.M. (1991).** Bis(tri-*n*-butyltin)oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes. *Arch. Toxicol.*, 65, 135-139.
- Raffray M., McCarthy D., Snowden R.T. & Cohen G.M. (1993).** Apoptosis as a mechanism of tributyltin cytotoxicity to thymocytes: relationship of apoptotic markers to biochemical and cellular effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 119, 122-130.
- Raines M.A., Kolesnick R.N. & Golde D.W. (1993).** Sphingomyelinase and ceramide activate mitogen-activated protein kinase in myeloid HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 268, 14572-14575.
- Reeves J.P. (1992).** Molecular aspects of sodium-calcium exchange. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292, 329-334.
- Rehfeldt W., Resch K. & Goppelt-Struebe M. (1993).** Cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> from human monocytic cells: characterization of substrate specificity and Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane association. *Biochem. J.*, 293, 255-261.
- Restrepo D., Kozody D.J. & Knauf P.A. (1987).** Changes in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulation upon granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Am. J. Physiol.*, 253, C619-C624.
- Rink T.J., Tsien R.Y. & Pozzan T. (1982).** Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes. *J. Cell Biol.*, 95, 189-196.
- Röderer G. (1983).** On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on the chrysophyte *Poteroochromonas malhamensis*. IV. Influence of lead antidotes and related agents. *Chem.-Biol. Interact.*, 46, 247-254.
- Rosenberg D.W., Anderson K.E. & Kappas A. (1984).** The potent induction of intestinal heme oxygenase by the organotin compound, bis(tri-*n*-butyltin)oxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 119, 1022-1027.
- Rovera G., Santoli D. & Damsky C. (1979).** Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 2779-2783.
- Sarafian T.A. (1993).** Methyl mercury increases intracellular Ca<sup>2+</sup> and inositol phosphate levels in cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.*, 61, 648-657.
- Sasaki K., Ishizaka T., Suzuki T. & Saito Y. (1988).** Determination of tri-*n*-butyltin and di-*n*-butyltin compounds in fish by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 360-363.
- Scharff O. & Foder B. (1993).** Regulation of cytosolic calcium in blood cells. *Physiol. Rev.*, 73, 547-582.
- Schüürmann G. & Röderer G. (1988).** Acute toxicity of organotin compounds and its predictability by quantitative structure-activity relationships (QSARs). In: *Heavy metals in the hydrological cycle*, (Astruc M. & Lester J.N., eds.). Publications Division, London, 433-440.
- Schwartzman R.A. & Cidlowski J.A. (1993).** Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev.*, 14, 133-151.

- Seifert R., Grünbaum L. & Schultz G. (1994).** Histamin  $H_1$ -receptors in HL-60 monocytes are coupled to  $G_i$ -proteins and pertussis toxin-insensitive  $G$ -proteins and mediate activation of  $Ca^{2+}$  influx without concomitant  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 349, 355-361.
- Selwyn M.J. (1976).** Triorganotin compounds as ionophors and inhibitors of ion translocating ATPases. In: *Organotin compounds: New chemistry and applications*, (Zuckerman J.J., ed.). American Chemical Society, Washington, DC, 204-226.
- Shivakumar R. (1993).** Leaden-footed plan. *Decan Harald, Newspaper, India*, 27.12.1993.
- Siebenlist K.R. & Taketa F. (1986).** Organotin-protein interactions. *Biochem. J.*, 233, 471-477.
- Simchowitz L., Foy M.A. & Cragoe E.J. (1990).** A role for  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange in generation of superoxide radicals by human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 265, 13449-13456.
- Simchowitz L., Textor J. & Vogt S.K. (1991).** Use of tributyltin to probe contribution of  $Cl^-/HCO_3^-$  exchange to regulation of steady-state  $pH_i$  in human neutrophils. *Am. J. Physiol.*, 261, C906-C915.
- Smith J.B., Dwyer S.D. & Smith L. (1989).** Decreasing extracellular  $Na^+$  concentration triggers inositol polyphosphate production and  $Ca^{2+}$  mobilization. *J. Biol. Chem.*, 264, 831-837.
- Smith W.L. (1989).** The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.*, 259, 315-324.
- Snoeijs N.J., van Iersel A.A., Penninks A.H. & Seinen W. (1986).** Triorganotin-induced cytotoxicity to rat thymus, bone marrow and red blood cells as determined by several in vitro assays. *Toxicology*, 39, 71-83.
- Steinberg T.H., Newman A.S., Swanson J.A. & Silverstein S.C. (1987).** Macrophages possess probenecid-inhibitable organic anion transporters that remove fluorescent dyes from the cytoplasmic matrix. *J. Cell Biol.*, 105, 2695-2702.
- Stephenson M.D. & Smith D.R. (1988).** Determination of tributyltin in tissues and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, 60, 696-698.
- Sullivan J.J., Torkelson J.D., Wekell M.W., Hollingworth T.A., Saxton W.L. & Miller G.A. (1988).** Determination of tri-*n*-butyltin and di-*n*-butyltin in fish as hydride derivatives by reaction gas chromatography. *Anal. Chem.*, 60, 626-630.
- Takahashi M., Liou S. Y. & Kuniyama M. (1995).**  $Ca^{2+}$ - and  $Cl^-$ -dependent, NMDA receptor-mediated neuronal death induced by depolarisation in rat hippocampal organotypic cultures. *Brain Res.*, 675, 249-256.
- Thomas J.A., Buchsbaum R.N., Zimniak A. & Racker E. (1979).** Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochem.* 18, 2210-2218.
- Thompson M., Huges L. & Hickman J.A. (1986).** The effects of phorbol esters on  $Ca^{2+}$  fluxes in dimethyl sulfoxide-differentiated HL-60 promyelocytic leukaemia cells. *Biochem. Soc. Transact.*, 14, 1152-1153.
- Tsukamoto Y., Sugimura K. & Suki W.N. (1991).** Role of  $Ca^{2+}/H^+$  antiporter in the kidney. *Kidney Int.*, 40, S-90-S-94.
- Tsunoda Y. (1993).** Receptor-operated  $Ca^{2+}$  signaling and crosstalk in stimulus secretion coupling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1154, 105-156.
- Tsunoda Y., Matsuno K., Tashiro T. (1991).** Cytosolic acidification leads to  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores in single and populational parietal cells and platelets. *Exp. Cell Res.*, 193, 356-363.
-

- Umweltbundesamt (1993).** Umweltdaten-kurzgefaßt. Umweltbundesamt, Berlin.
- Vandenabeele P., Declercq W., Beyaert R. & Fries W. (1995).** Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.*, 5, 392-398.
- Verity M.A. (1995).** Nervous system. In: *Metal Toxicology* (Goyer R.A., Klaassen C.D. & Waalkes M.P., eds.). Academic Press, New York, 199-223.
- Verity M.A., Sarafian T.S., Guerra W., Ettinger A. & Sharp J. (1990).** Ionic modulation of triethyllead neurotoxicity in cerebellar granule cell culture. *NeuroToxicol.*, 11, 415-426.
- Von Burg R. & Greenwood M.R. (1991).** Mercury. In: *Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance*, (Merian E., ed.). Verlag Chemie, Weinheim, 1045-1088.
- Vos J., Van Loveren H., Wester P. & Vethaak D. (1989).** Toxic effects of environmental chemicals on the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 289-292.
- Walser B. & Krug H.F. (1995).** Synergismus von umweltrelevanten Schwermetallverbindungen und Nahrungsmitteladditiva bei der Induktion von Allergie-relevanten Mediatoren. In: *4. Statuskolloquium des PUG am 15. u. 16. März 1995 im Forschungszentrum Karlsruhe*, (Horsch F., Friebel P., Seidel A. & Wiebel A., eds.), Forschungszentrum Karlsruhe, 77-88.
- Walsh T.J., McLamb R.L., Bondy S.C., Tilson H.A. & Chang L.W. (1986).** Triethyl and trimethyl lead: effects on behavior, CNS morphology and concentrations of lead in blood and brain of rat. *NeuroToxicol.*, 7, 21-34.
- Werlen G., Belin D., Conne B., Roche E., Lew D.P. & Prentki M. (1993).** Intracellular  $Ca^{2+}$  and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, 268, 16596-16601.
- Wijermans P.W., Ossenkoppele G.J., Huijgens P.C., Imandt L.M., DeWaal F.C. & Langhuijsen M.M. (1987).** Quantitative enzyme determination: a parameter for leukemic cell differentiation. *Leukemia Res.*, 11, 641-648.
- Wilk-Blaszczak M.A., Gutowski S., Sternweis P.C. & Belardetti F. (1994).** Bradykinin modulates potassium and calcium currents in neuroblastoma hybrid cells via different pertussis toxin-insensitive pathways. *Neuron*, 12, 109-116.
- Xing M. & Mattera R. (1992).** Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase  $A_2$  by G-proteins and  $Ca^{2+}$  in HL-60 granulocytes. *J. Biol. Chem.*, 267, 25966-25975.
- Xing M., Thevenod F. & Mattera R. (1992).** Dual regulation of arachidonic acid release by  $P_{2U}$  purinergic receptors in dibutyryl cyclic AMP-differentiated HL-60 cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 6602-6610.
- Yallapragada P.R., Vig P. & Desai D. (1990).** Differential effects of triorganotin on calmodulin activity. *J. Toxicol. Environ. Health*, 29, 317-327.
- Yang Y. B., Kristian T., Kristianova V., Mellegard P. & Siesjö B.K. (1995).** The influence of calcium transients on intracellular pH in cortical neurons in primary culture. *Brain Res.*, 676, 307-313.
- Yumoto K., Yamaguchi H. & Ochi R. (1995).** Depression of ATP-induced  $Ca^{2+}$  signalling by high  $K^+$  and low  $Cl^-$  media in human aortic endothelial cells. *Jap. J. Physiol.*, 45, 111-122.
- Zaucke F. (1993).** Struktur-Wirkungs-Beziehungen trialkylierter Zinnverbindungen bei der Zytotoxizität und ihren biochemischen Wirkungen in menschlichen HL-60 Zellen. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe.
- Zaucke F., Zöltzer H. & Krug H.F. (1995).** Cell damage and apoptosis induced by organometals. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 376, S170.

- 
- Zhang W., Zhang G.G., He H.Z. & Bolt H.M. (1994).** Early health effects and biological monitoring in persons occupationally exposed to tetraethyl lead. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 65, 395-399.
- Zimmermann H.P., Faulstich H., Hänsch G.M., Doenges K.H. & Stoumaras C. (1988).** The interaction of triethyl lead with tubulin and microtubules. *Mutation Res.*, 201, 293-302.
- Zweifach A. & Lewis R.S. (1993).** Mitogen-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 6295-6299.
-