

KfK 5269 B
Juli 1994

**Untersuchungen zum
Lipidstoffwechsel an zellulären
Systemen unter besonderer
Berücksichtigung der
Phospholipase A₂**

**U. Brückner-Nieder
Institut für Toxikologie**

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe
Institut für Toxikologie

KfK 5269 B

**Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel
an zellulären Systemen
unter besonderer Berücksichtigung der
Phospholipase A₂**

Uta Brückner-Nieder

Dissertation genehmigt von der Fakultät
für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

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

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0303-4003

Zusammenfassung

Aufnahme, Transport und Umbau synthetischer Lipide wurde an unterschiedlichen Zellen in Kultur untersucht. Diese Lipide sollten auch auf ihre Eignung als Substrat für zelluläre Phospholipasen getestet werden, da vor allem die Phospholipase A₂ an wichtigen regulatorischen Prozessen im Organismus beteiligt ist und keine direkten Methoden zur Messung ihrer Aktivität in lebenden Zellen zur Verfügung stehen. Die Verwendung vornehmlich an der *sn*2-Position markierter Lipide ergab folgende Resultate:

Eine gesättigte Fettsäure (Palmitinsäure) verhinderte zwar nicht die Aufnahme des Lipides in die Zelle, es kam aber auch nach Stimulierung zu keinem Turnover.

Eine ungesättigte Fettsäure (Arachidonsäure) erbrachte dagegen vor allem nach Stimulierung der Zellen mit Calciumionophor eine Freisetzung der markierten Fettsäure bzw. einen Umbau innerhalb der Phospholipidklassen.

Für Inkubationen der Zellen im Bereich von Minuten bzw. wenigen Stunden ist die Messung freigesetzter, radioaktiv markierter, ungesättigter Fettsäuren, wie die der Arachidonsäure, ein guter Parameter für eine induzierte Aktivität der PLA₂.

Als Ersatz für radioaktive Markierung bei gleichzeitiger hochempfindlicher Analytik wurden Lipide verwendet, die ein fluoreszierendes Chromophor trugen. Untersucht wurden fettsäureähnliche Verbindungen mit unterschiedlicher Kettenlänge und drei verschiedenen fluoreszierenden Strukturen: NBD, Pyren und PHTB.

Für die Messung der Aktivität der PLA₂, und dafür sollten die Substrate dienen, was zu fordern, daß einmal freigesetzte Fettsäure nicht reacyliert wird, wie dies für natürliche und radioaktiv markierte Fettsäuren der Fall ist. Von allen fünf getesteten fluoreszierenden Substanzen wurde diese Forderung nur von C₆-NBD-FS erfüllt.

Die C₆-NBD-FS wurde daher für die Markierung von PC, PA, PS, PE und DG an der *sn*2-Stelle verwendet. Diese Modellsubstanzen wurden, mit Ausnahme des PC, eigens für diesen Zweck synthetisiert. Von den angebotenen Lipiden sind nur PC, PS und PA von den Zellen aufgenommen und in die Membranen eingebaut worden.

In allen Zellkulturen wurde ein Abbau der synthetischen Lipide in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Nach steigendem Grundumsatz geordnet ergab sich die Reihenfolge:

NFB-Zellen < NG-Zellen < HL-60 Zellen.

Eine stimulierte Freisetzung der fluoreszierenden Fettsäure konnte sowohl für HL-60 Zellen als auch für NFB-Zellen nachgewiesen werden. Wie auf Grund der stark veränderten Struktur gegenüber Arachidonsäure zu erwarten war, ist die Menge der freigesetzten Fettsäure niedrig, jedoch durch die empfindliche Analytik gut nachweisbar.

Erste Versuche zu Langzeitinkubationen mit Umweltchemikalien (hier Triethylblei) ergaben auch hier im Falle der NFB-Zellen eine erhöhte Freisetzung der C₆-NBD-FS aus markiertem PC.

Die Verwendung von Alternativen zur radioaktiven Markierung erscheint daher möglich, vor allem da die Inkubationszeiten wesentlich verlängert werden können und daher die Konzentrationen der zu untersuchenden Toxine einem umweltrelevanten Bereich sehr nahe kommen.

Investigation on Lipid Metabolism in Different Cellular Systems, with Special Regard to Phospholipase A₂

Summary

Incorporation, transport and modification of synthetic lipids were studied in various cultured cell lines. Additionally, these lipids were tested for their suitability as substrates for cellular Phospholipases, because Phospholipase A₂ is involved in important regulatory processes in the organism, and no direct methods to study its activities in living cells exist.

Using lipids which were mainly marked at the *sn*2-position, the following results were obtained. When Palmitic acid, a saturated fatty acid is a constituent of the synthetic lipid it does not prevent incorporation of the lipid into cells, although turnover of the lipid does not occur even after stimulation. However, if Arachidonic Acid, an unsaturated fatty acid, is a constituent of the lipid, there is a release of the marked fatty acid and a modification within the Phospholipidclass, especially after stimulation of the cells with calcium-ionophore. The release of radioactive, unsaturated fatty acid such as Arachidonic acid from labelled cells after incubation for minutes or several hours yielded valuable information about the induced activity of PLA₂.

As a possible alternative to radioactive markers, fluorescent labels with equivalent sensitivity to the radioactive markers were investigated. To be also useful for the determination of the activity of the PLA₂, the released fatty acid should not be reacylated, as is the case of natural and radioactive fatty acids. Compounds similar to fatty acids were therefore selected for investigation. These contained various chain lengths and were substituted with the fluorescent substances NBD, Pyrene and PHTB. Of the fluorescent substances investigated, only C₆-NBD-FS fulfilled both of the above requirements. Consequently PC, PA, PS, PE and DG substituted with C₆-NBD-FS at the *sn*2-position were used for analysis. These materials, except PC, had to be synthesized first. Only PC, PS and PA were absorbed by the cells and were incorporated into membranes.

For all cell cultures, a time dependent decomposition of the synthetic lipids was observed. For the reaction ratio, the following order was determined:

NFB-cells < NG-cells < HL-60 cells.

Stimulated release of fluorescent fatty acids was observed in HL-60 cells and NFB-cells. The amount of released fatty acids was small, as was expected, because the structure of the fatty acid is considerably altered compared to Arachidonic Acid. Nevertheless, the release could be easily observed due to the high sensitivity of the analysis.

In the case of NFB-cells, initial studies of long term incubation with environmental chemicals (here triethyl lead) also yielded a higher release of C₆-NBD-FS from marked PC in comparison to control cells.

This demonstrates the superiority of non-radioactive marking, particularly because the incubation time can be considerably increased, and additionally, the concentrations of the toxins can be reduced to an environmentally relevant level.

Abkürzungsliste:

A23187	Calciumionophor A23187
Ara	Arachidonsäure
¹⁴ C-Ara-PC	1-Stearoyl-2-[1- ¹⁴ C]-arachidonyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
¹⁴ C-Ara-PE	1-Acyl-2-[1- ¹⁴ C]-arachidonyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
¹⁴ C-Pal-PC	1-Palmitoyl-2-[1- ¹⁴ C]-palmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
Pal- ³ H-PC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[methyl- ³ H]-phosphocholin
C ₆ -NBD-DG	1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl- <i>sn</i> -glycerin
C ₆ -NBD-FS	1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexansäure
C ₁₁ -NBD-FS	1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminoundecansäure
C ₆ -NBD-PA	1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat, Natriumsalz
C ₆ -NBD-PC	1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
C ₆ -NBD-PS	1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin, Natriumsalz
DG	Diacylglycerin
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FKS	Fötales Kälberserum
FS	Fettsäure
HL-60 Zellen	human leukemic cell line
ICOS	Eicosanoide
MTBE	Methyltertiärbutylether
NBD	N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)
NBT	Nitroblautetrazolium
NFB-Zellen	normal fibroblast cells
NG-Zellen	Neuroblastoma-Gliomazelllinie NG108-CC15
PBS	phosphate buffered saline
PA	Phosphatidsäure
PAF	platelet-activating-factor
Pal	Palmitinsäure
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PHTB-FS	4-(6-Phenyl-1,3,5-hexatrienyl)-β-benzpropansäure
PIPS	Phosphatidylinositolphosphat und Phosphatidylinositoldiphosphat
PL	Phospholipide
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PS	Phosphatidylserin
4-Pyren-FS	4-(1-Pyren)-buttersäure
10-Pyren-FS	10-(1-Pyren)-decansäure
SM	Sphingomyelin
sn	stereospezifische Nummerierung
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	10
2.1 Zellkulturen	10
2.1.1 Handhabung der Zellkulturen	10
2.1.2 HL-60 Zellen	11
2.1.3 NFB-Zellen	12
2.1.4 NG108-CC15-Zellen	12
2.2 Lipide	13
2.2.1 Extraktion der Lipide	13
2.2.2 Radioaktiv markierte Lipide	14
2.2.2.1 Trennung der radioaktiv markierten Lipide	14
2.2.2.2 Quantifizierung der radioaktiv markierten Lipide	14
2.2.3 Fluoreszenzmarkierte Lipide	14
2.2.3.1 Erstellen von Emissions- und Exzitationsspektren	16
2.2.3.2 Trennung und Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Lipide	16
2.2.3.3 Herstellung und Reinigung der nicht kommerziell erhältlichen Lipide	20
2.2.3.4 NMR-Spektroskopie	21
2.2.4 Herstellung von Vesikeln	21
2.2.5 Untersuchungen zur Stabilität der Lipide in verschiedenen Inkubationsmedien	21
2.2.6 Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten von C ₆ -NBD-PC und C ₆ -NBD-FS in Abhängigkeit von Substanz und Lösungsmittel	22
2.2.7 Untersuchung zum Abbau von C ₆ -NBD-PC durch externe PLA ₂	22
2.3 Zellversuche	22
2.3.1 Inkubation der Zellen mit radioaktiv markierten Lipiden	23
2.3.2 Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Vesikeln	23
2.3.3 Bestimmung der aufgenommenen Lipidmengen	24
2.3.4 Turnover-Untersuchungen	24
2.3.4.1 Turnover-Untersuchungen fluoreszierender Fettsäuren in Zellkulturen	24
2.3.4.2 Turnover-Untersuchungen markierter Lipide in Zellkulturen	25
2.3.5 Versuche zur Stimulierbarkeit der zellulären PLA ₂ mit verschiedenen aktivierenden Substanzen	25
2.4 Mikroskopische Untersuchungen	26
2.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Durchlichtmikroskop	26
2.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Laserscanmikroskop	26
2.4.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	27
2.4.4 Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop	28
2.5 Darstellung der Ergebnisse	28
2.6 Statistische Auswertung	29

3 Ergebnisse	30
3.1 Untersuchungen zu den verwendeten fluoreszierenden Lipiden	30
3.1.1 Auswahl geeigneter fluoreszierender Fettsäuren durch Einbauuntersuchungen in zelluläre Lipide	30
3.1.3 Untersuchung der Eigenschaften der fluoreszierenden Lipide	33
3.1.3.1 Fluoreszenzspektren	33
3.1.3.2 Bestimmung der Fluoreszenzintensität von C ₆ -NBD-PC und C ₆ -NBD-FS in Abhängigkeit von Substanz und Lösungsmittel	35
3.1.3.3 Stabilitätsuntersuchungen der Lipide in verschiedenen Inkubationsmedien	36
3.1.3.4 Stabilitätsuntersuchungen von markierten Lipiden in verschiedenen zellulären Systemen	38
3.1.4 Abbaubarkeit von C ₆ -NBD-PC durch externe PLA ₂	40
3.1.5 Mikroskopische Untersuchungen zur Beschaffenheit der Vesikel	40
3.2 Untersuchungen zum Ein- und Umbau der Lipide in zelluläre Systeme	43
3.2.1 Mikroskopische Untersuchungen	43
3.2.1.1 Fluoreszenzmikroskopie	43
3.2.1.2 Elektronenmikroskopie	53
3.2.2 Aufnahme extern zugegebener Lipide	57
3.2.3 Turnover-Bestimmungen radioaktiv markierter Lipide in HL-60 Zellen	59
3.2.3.1 Turnover radioaktiv markierter Arachidonsäure	59
3.2.3.2 Turnover von radioaktiv markiertem PC, welches an der sn-2 Position Palmitinsäure trägt	60
3.2.3.3 Turnover von radioaktiv markiertem PC, welches an der sn-2 Position Arachidonsäure trägt	61
3.2.3.4 Turnover von radioaktiv markiertem PE, welches an der sn-2 Position Arachidonsäure trägt	63
3.2.4 Turnover-Bestimmungen NBD-markierter Lipide in Zellen	63
3.2.4.1 Turnover von NBD-markiertem PC	63
3.2.4.2 Turnover von NBD-markiertem PA	67
3.2.4.3 Turnover von NBD-markiertem PS	69
3.2.5 Tabellarische Zusammenfassung der Versuche zum Turnover markierter Lipide	70
3.3 Untersuchungen zum Ab- und Umbau von Lipiden nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Agentien	71
3.3.1 Effekt von Calciumionophor auf den Metabolismus radioaktiv markierter Lipide in HL-60 Zellen	72
3.3.1.1 Behandlung ¹⁴ C-Pal-PC bzw. Pal- ³ H-PC markierter HL-60 Zellen	72
3.3.1.2 Behandlung ¹⁴ C-Ara-PC markierter HL-60 Zellen	73
3.3.1.3 Behandlung ¹⁴ C-Ara-PE markierter HL-60 Zellen	75
3.3.2 Ergebnisse nach Einwirkung von Calciumionophor, Bradykinin oder Melittin auf fluoreszenzmarkierte Zellen	78
3.3.2.1 Behandlung von C ₆ -NBD-PC markierten Zellen	78
3.3.2.2 Behandlung von C ₆ -NBD-PA markierten Zellen	81
3.3.2.3 Behandlung von C ₆ -NBD-PS markierten HL-60 Zellen	83

3.3.3 Ergebnisse nach Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit den schwermetallorganischen Verbindungen Triethylbleichlorid und Dibutylzinndichlorid	83
3.3.4 Tabellarische Zusammenfassung der Versuche nach Behandlung der Zellen	86
4 Diskussion	89
5 Literaturverzeichnis	103

1 Einleitung

Die kleinste selbständige Einheit, die für Untersuchungen von Geweben bzw. Organismen relevant ist, ist die Zelle. Weitgehend unabhängig wird diese Einheit die sie umgebende Zellmembran. Biomembranen sind jedoch auch zur Kompartimentierung wichtig. Funktionell gesehen ist diese Barriere eine Voraussetzung für den kontrollierten Ablauf enzymologischer Vorgänge innerhalb der einzelnen Kompartimente.

Grundsätzlich bauen sich Membranen aus Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten auf. Die Lipide bilden dabei die Grundstruktur der Membranen, eine bimolekulare Schicht (Lipiddoppelschicht), aus, in die andere Moleküle wie zum Beispiel Proteine an- bzw. eingelagert sind. Das Verhältnis Protein zu Lipid liegt dabei je nach Membrantyp in der Größenordnung zwischen 4:1 und 1:4. Die wichtigsten Lipide stellen darin die Phospholipide, wobei Phosphatidylcholin mit einem molaren Anteil von 25 % den größten Anteil hat. Daneben existieren noch Glykolipide und Cholesterin.

Die Synthese der Membranlipide findet hauptsächlich am Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt. Die synthetisierenden Enzyme sind hier so angeordnet, daß Aufnahme der Edukte und Abgabe der Produkte Richtung Zytosol ausgerichtet sind (Alberts et al., 1987 a). Für Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) sind verschiedene Synthesewege beschrieben. Bei Säugern wird aus der Nahrung vorhandenes Cholin als aktiviertes Cytidindiphosphat-Cholin (CDP-Cholin) bzw. PE als aktiviertes CDP-Ethanolamin an ein Diacylglycerin unter Bildung der jeweiligen Phospholipide gebunden. Diacylglycerin selber wird aus Phosphatidsäure gebildet, welche zuvor von Glycerinphosphat durch die Reaktion mit zwei Fettsäure-Acyl-CoA's bereitgestellt wird.

Der *de-novo* Syntheseweg verläuft über die Bildung von Phosphatidylserin (PS). Dabei wird zunächst wiederum aus Glycerinphosphat unter Anhängen zweier durch CoA aktivierter Fettsäure-Einheiten die Zwischenstufe Phosphatidsäure gebildet. Aus der Phosphatidsäure entsteht durch Aktivierung mittels Cytidindiphosphat CDP-Diacylglycerin. An diese aktivierte Phosphatidyleinheit wird nun die Alkoholgruppe des Serin angehängt. Das Serin selber liegt also in diesem Fall nicht in aktivierter Form vor. Durch Decarboxylierung des PS entsteht zunächst PE, durch Dreifachmethylierung des PE-Stickstoffs das PC (Struyer, 1991 a). Einen guten Allgemeinüberblick über diese Synthesewege verschaffen zudem die *Biochemical pathways* von Michal, 1982.

Die beiden Einzelschichten der Lipiddoppelschicht besitzen einen asymmetrischen Aufbau. Bei den Proteinen wird die Asymmetrie bereits durch die Synthese festgelegt. Sie können anschließend nicht mehr zwischen den Membranhälften wechseln. Aber auch die Verteilung der verschiedenen Lipide ist auf beiden Seiten der Doppelschicht unterschiedlich. Kohlehydrateinheiten sitzen zudem nur an der extrazellulären Seite der Plasmamembran.

Die Asymmetrie der Membranen ist eine fundamental für die Funktionsweise von Membranen notwendig, denn Funktionen wie Transport, Kommunikation und Energieübertragung könnten ohne die verschiedenartige, aber wohl definierte Verteilung von z.B. Enzymen oder Rezeptoren nicht funktionieren (Struyer, 1991 b und Mouritsen OG. und Jørgensen, 1992). Dabei ist nicht nur die asymmetrische Anordnung von Proteinen, sondern auch die der Lipide wichtig. Zum Beispiel werden Erythrozyten nach einer Lipidverschiebung in wesentlich größerem Umfang von Makrophagen erkannt

und scheiden dadurch aus dem Retikuloendothelialen System aus (Tanaka und Schroit, 1983 bzw. Schroit et al., 1985). Der direktere Einfluß wird durch die Wirkungsweise von Lipasen, die jeweils bestimmte Lipide bevorzugt abbauen, deutlich. Sie haben, wie an Hand der Phospholipase A₂ (PLA₂) später gezeigt, einen enormen Einfluß auf zelluläre Wirkungsmechanismen. Einen Überblick über verschiedene Signal-Transduktionsprozesse verschafft der Artikel von Ganong, 1991.

Die Asymmetrie der Membranen liegt bereits bei der Entstehung der Zelle vor. Wie schon erwähnt, werden nach Alberts et al., 1987 a die Lipide entsprechend der Anordnung der synthetisierenden Enzyme, nur auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der ER-Membran gebildet. Um letztendlich nicht nur eine Monoschicht zu bilden, müssen die Lipide anschließend mit Hilfe spezifischer Transferproteine die Möglichkeit haben, auf die andere Seite der Doppelschicht zu wechseln, also den sogenannten Flip-Flop auszuführen (Devaux, 1992). Der Austausch von Lipiden innerhalb einer Schicht geht zwar sehr schnell und einfach vor sich (lateraler Platzwechsel benachbarter Lipidmoleküle innerhalb einer Einzelschicht ungefähr 10⁷ mal pro Sekunde), der transversale Wechsel (Flip-Flop) zwischen den Einzelschichten der Lipiddoppelschicht dafür um so seltener (weniger als einmal in zwei Wochen) (Alberts et al., 1987 b). Nach Lodish und Rothman, 1979 ist die Asymmetrie ein thermodynamisches Gleichgewicht. Dieses kann zum Beispiel dadurch entstehen, daß sich auf einer Membranseite vorwiegend Proteine befinden, die eine erhöhte Affinität zu bestimmten Lipiden besitzen. Dies bedeutet, daß die Transferproteine nur den Übergang von einer Membranseite zur anderen erleichtern, die Richtung aber nicht festlegen. Im Gegensatz zu den Proteinen, die, wie bereits gesagt, durch ihren Syntheseort eine festgelegte asymmetrische Anordnung in der Membran haben, sind nach Lodish und Rothman, 1979 die Enzyme für den Lipidaustausch zwischen den Schichten der Doppelschicht nur bei noch synthetisierenden, also noch nicht ausdifferenzierten, Zellen aktiv. Neuere Untersuchungen weisen bei Zellen in Zellkultur auch einen Lipidtransfer in ausdifferenzierten Zellen nach, so zum Beispiel bei Erythrozyten (Schrier et al., 1992 und Devaux et al., 1990), V79 Fibroblasten (Sleight und Hopper, 1991; Sleight und Pagano, 1985; Martin und Pagano, 1987), Rattenleberzellen (Vance, 1991) oder auch bei Lymphozyten (Zachowski et al., 1987). Rückschlüsse von einer Zellart bzw. Zelllinie auf eine andere sind offensichtlich nur sehr begrenzt möglich, zumal auch bereits ein Transport ohne Transferprotein nachgewiesen werden konnte (z.B. Gnamusch et al., 1992).

Ein weiteres, zur Asymmetrie führendes Phänomen ist der Lipidaustausch zwischen den Membranen. Der Transport von Lipiden vom ER zu anderen Kompartimenten wie den Mitochondrien wird nach Alberts et al., 1987 b durch Phospholipid-Transferproteine bewerkstelligt. Sie "extrahieren" jeweils spezifisch Lipide aus der Membran und transportieren sie zu Membranen mit geeigneten Eigenschaften. Die Transportrichtung ist dabei durch einen Konzentrationsgradienten zwischen lipidreicher und lipidarmer Membran vorgegeben.

Werden Vesikel für Transportzwecke zum Beispiel aus dem ER abgeschnürt und in andere Membranen integriert, so wird die Lipidanordnung der Innen- und Außenseite zu der anderen Membran übernommen (Alberts et al., 1987 b). Lodish und Rothman, 1979 wie auch Morré et al., 1979 sehen hierin nicht nur die Transportaufgabe, sondern allgemein die Übertragung asymmetrischer Membranen.

Die Membrandoppelschichten sind so aufgebaut, daß die Menge an cholinhaltigen Lipiden, PC und Sphingomyelin (SM) an der dem Zytoplasma abgewandten Seite höher ist, während die Aminophos-

pholipide PS und PE vorwiegend an der anderen Seite sitzen (Bretscher, 1972; Gordesky und Marinetti, 1973 und Verkleij et al., 1973). Die zellspezifisch unterschiedliche Verteilung in anderen Zellen zeigt die Veröffentlichung von Cullis und Hope, 1985 auf.

Für den Transport der verschiedenen Lipide in der Zelle gibt es festgelegte Wege, die im Übersichtsartikel von Voelker, 1990 zusammengestellt sind. Aus diesem Artikel ist auch die im nachfolgenden dargestellte Abb. 1 in Abänderung entnommen. Sie stellt die Wege und damit die Lokalisation der Lipide sehr gut dar:

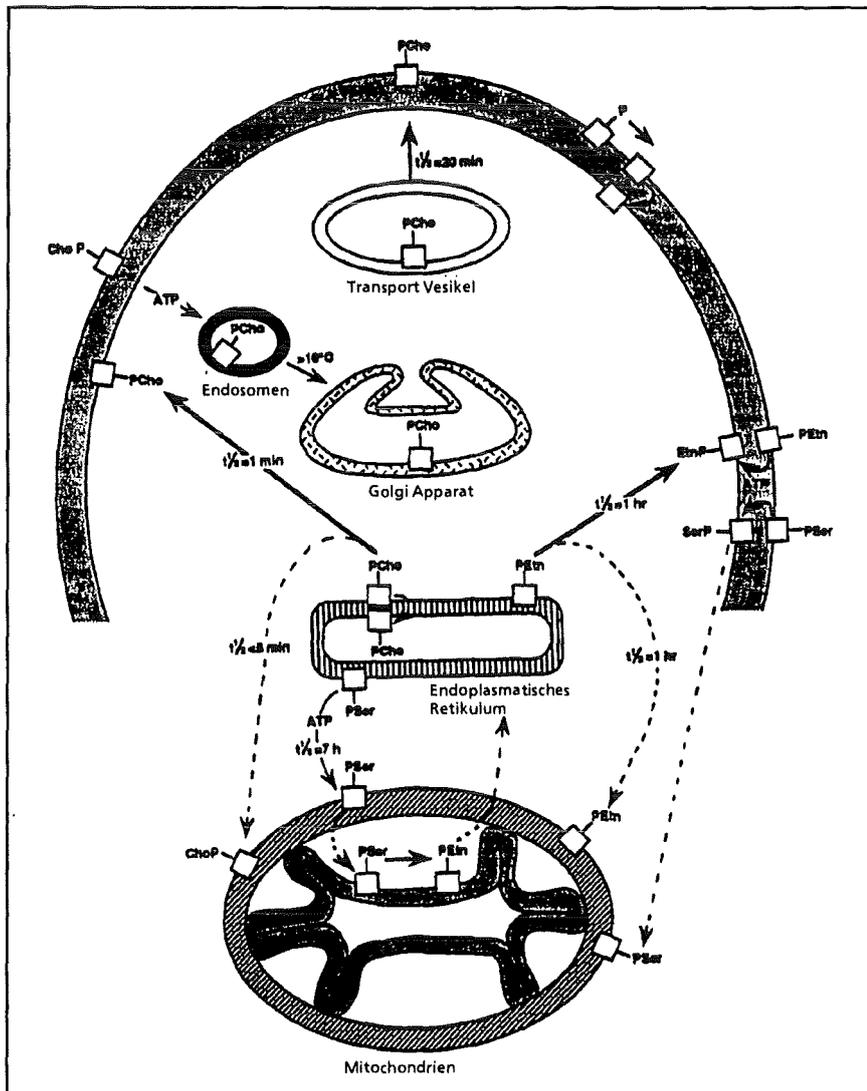


Abb. 1 Schematische Darstellung der Lipidtranslokationen in tierischen Zellen (verändert nach Voelker, 1990).

Abkürzungen: Cho: Cholin Etn: Ethanolamin
 Ser: Serin P: Phosphat

Gestrichelte Linien: noch nicht endgültig geklärte Translokationsprozesse

Alle Membranen unterliegen sozusagen routinemäßig einem Turnover, wobei die Lipide ebenfalls regelmäßig de- und reacyliert werden. Für die Deacylierung sind die Lipasen, für die Phospholipide speziell die Phospholipasen zuständig. Diese werden je nach ihrer Angriffsstelle unterschiedlich bezeichnet (Abb. 2).

Von allen Phospholipasen trat in den letzten Jahren die Phospholipase A₂ (PLA₂) zunehmend in den Vordergrund wissenschaftlichen Interesses. Die Existenz dieses Enzyms ist schon seit über 100 Jahren durch Bókay, 1877-78 bekannt und ist damit als erste der Phospholipasen beschrieben worden. Ihr Vorkommen ist ubiquitär. Am besten ist PLA₂ aus Schlangengift und die pankreatische PLA₂ bekannt, aber auch in der Pflanzenwelt ist dieses Enzym anzutreffen (z.B. Scherer und André, 1989 oder Ivanov, 1991). Ihre Bedeutung liegt in normalen zellulären

Umbaumaßnahmen (Lands und Merckl, 1963), dem Abbau von Membranen und damit dem Einfluß auf das Absterben von Zellen (Kondakova et al., 1991), aber auch, wie im Laufe der letzten 20 Jahre immer deutlicher wurde, in so wichtigen zellulären Regulationsmechanismen wie dem Eicosanoidstoffwechsel und der Produktion von *platelet-activating-factor* (PAF) (Snyder, 1985; Koltai et al., 1991). Übersichtsartikel hierzu bieten die Veröffentlichungen von Chang et al., 1987, Waite, 1985 oder auch Waite, 1987.

Die PLA₂ spaltet die Esterbindung der Fettsäure, die sich an der *sn2*-Position befindet. Als am besten geeignete Substrate werden PC und PE genannt (Dennis, 1983), wobei Balsinde et al., 1988 in menschlichen Neutrophilen nochmals unterscheiden können zwischen der PLA₂ der Plasmamembran, die Phosphatidylinositol (PI) bevorzugt, und der intrazellulären PLA₂, die eben PC und PE hauptsächlich verwendet. Es lassen sich membranständige und lösliche PLA₂-Arten voneinander unterscheiden. Die membranständigen PLA₂ sind hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert sowie an azurophilen Granula und einer bisher nicht näher bestimmbareren Fraktion, die eine etwas höhere Dichte besitzt als die, welche Granula und ER enthält (Diez et al., 1990). Die genaue Anordnung in der Doppelschicht ist noch nicht völlig geklärt, wobei eine Lokalisation an der jeweils zum Zytoplasma weisenden Lipidschicht favorisiert wird. Levrat und Louisot, 1992 fanden allerdings auch an der Innenmembran von Mitochondrien eine gewisse Aktivität.

Die PLA₂ ist normalerweise nur mäßig aktiv, da sie zu den Enzymen, die durch Deacylierung zum Membranabbau beitragen, gehört. Die Reacylierung der durch dieses Enzym abgebauten Lipide geschieht durch die Acyl-CoA-Synthetase und die Lysophospholipid-Acyl-Transferase. Die Fettsäure, die hauptsächlich durch den Abbau freigesetzt wird, ist die Arachidonsäure, da diese vorwiegend an der *sn2*-Position verestert ist. Gerade diese Fettsäure übt, wenn sie als freie Säure vorliegt, die Funktion eines *second messengers* aus, da sie die Vorstufe der Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane ist. Aber auch die Entstehung von PAF wird durch die PLA₂ bewerkstelligt. Um die Bil-

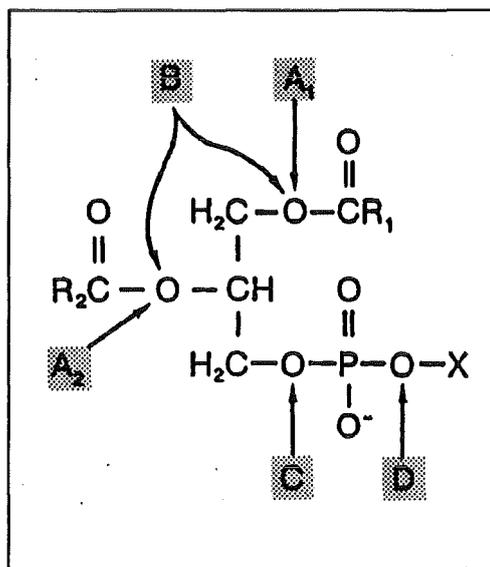


Abb. 2 Angriffsstellen der verschiedenen Phospholipasen

dung dieser Substanzen im normalen Zellablauf möglichst gering zu halten, muß die Reacylierung nach Freisetzung der Fettsäure schnell stattfinden, so daß praktisch keine freie Fettsäure existiert (Irvine, 1982). Eine knappe schematische Zusammenfassung der zellulären Vorgänge gibt Abb. 3.

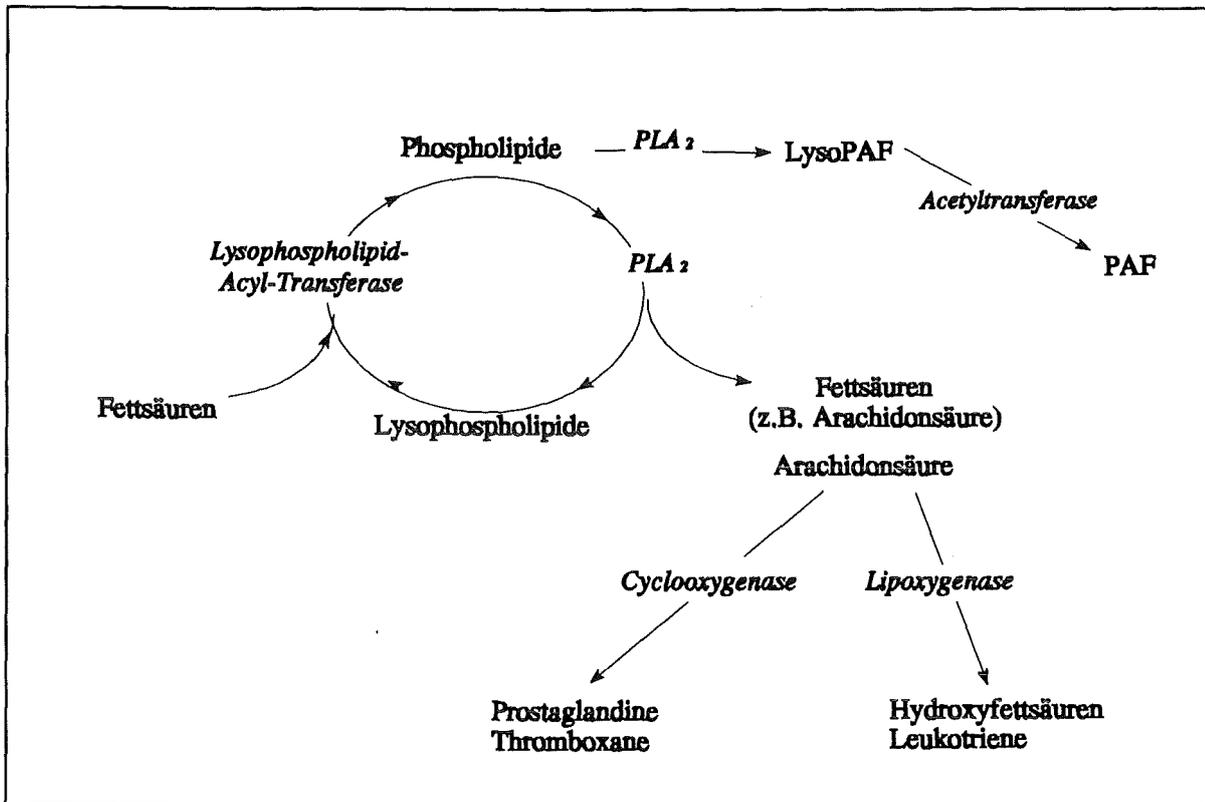


Abb. 3 Schematische Darstellung der De- und Reacylierung von Membranphospholipiden sowie der Biosynthese von PAF und den Lipoxy- und Cyclooxygenaseprodukten der Arachidonsäure.

Außerhalb dieser normalen zellulären Prozesse kommt der PLA₂ eine große Bedeutung bei regulatorischen Vorgängen zu. Durch dieses Enzym kommt es letztlich zur Bildung von Eicosanoiden und PAF. Die Freisetzung von Prostaglandinen gilt im Zusammenhang mit entzündlichen Reaktionen als gesichert und ist auch beim Menschen nachgewiesen (Schrör, 1984). Mittlerweile geht man davon aus, daß eine Hyperaktivität der PLA₂ im Falle von Entzündungen relevant ist (Pruzanski und Vadas, 1991; Zimmermann et al., 1992). Speziell Krankheiten wie Allergie (Barnes et al., 1988), Asthma, Rhinitis (Mehta et al., 1990), aber auch akute Pankreatitis (Mäkelä et al., 1990) und der aus der Intensivmedizin bekannte septische Schock (Green et al., 1991) werden darauf zurückgeführt.

Für Untersuchungen über die Auswirkungen der Hyperaktivität der zellulären PLA₂ stehen verschiedene das Enzym stimulierende Agentien zur Verfügung. Die Aktivierung verläuft dabei wahrscheinlich rezeptorvermittelt und zwar über die Kopplung an G-Proteine (Axelrod et al., 1988).

Da das Enzym, wie so viele andere, auch rezeptorunabhängig durch Calcium stimulierbar ist (Marshall und McCarte-Roshak, 1992), bietet sich in erster Linie das Calciumionophor A23187 an. Es kann in Membranen interkalieren und bewirkt den Austausch von Calciumionen gegen Protonen des Zytoplasmas (Alberts et al., 1987 b). Damit verbunden ist gleichzeitig eine zellschädigende Wirkung.

Da Calcium eine stark stimulierende Wirkung auf viele Enzyme hat, wird A23187 häufig als Vergleichswert für eine maximale Stimulierung verwendet.

Eine weitere, in der Literatur gerade im Zusammenhang mit NG-Zellen (Neuroblastoma-Glioma Zellen) erwähnte Substanz, ist Bradykinin. Es gehört zur Gruppe der Gewebshormone. Bei mehreren Zelllinien wird ihm eine indirekte Aktivierung der PLA₂ durch Erhöhung des intrazellulären Calciums (Yano et al., 1984; Ogura et al., 1990; Okajima und Kondo, 1992), aber auch eine direkte Stimulierungswirkung (Burch und Axelrod, 1987; Slivka und Insel, 1988) zugeschrieben.

Melittin ist der Hauptbestandteil des Bienengifts. Von ihm ist ebenfalls bekannt, daß es die PLA₂ stimuliert (Shier, 1979; Bomalaski et al., 1989). Neben dieser direkten Wirkung enthält Melittin selbst noch geringe Mengen an PLA₂-Aktivität (Dempsey, 1990).

Wie Ergebnisse der Arbeitsgruppe Krug belegen, stimulieren auch schwermetallorganische Verbindungen die PLA₂. Versuche zu diesem Enzym mit Thrombozyten, die unter dem Einfluß von Triethylblei aggregieren, boten erste eindeutige Hinweise (Krug und Berndt, 1987). Untersuchungen mit HL-60 Zellen und einigen Schwermetallverbindungen von Quecksilber und Zinn stützten die These, daß diese Verbindungen tatsächlich nicht nur die einbauenden Enzyme hemmen, sondern hauptsächlich die PLA₂ stimulieren (Krug und Cullig, 1991; Krug, 1992; Käfer et al., 1992). Schanne et al., 1989 wiesen zudem eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Calcium durch Blei bei NG-Zellen nach, was eine anschließende Stimulierung der PLA₂ wahrscheinlicher macht. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Kaefer et al., 1988, die den Einfluß der Quecksilberverbindung Thimerosal auf Peritonealmakrophagen der Maus untersuchten. Auch sie fanden einen Anstieg der Calciumkonzentration als Reaktion auf das Schwermetall.

Es existiert noch eine Reihe weiterer stimulierender Agentien, die jedoch weniger ausführlich beschrieben sind. Die Wirkungsweise der schwermetallorganischen Verbindungen ist im Gegensatz zu den "konventionellen" Stimulantien noch nicht so umfangreich untersucht. Dafür eröffnen diese Substanzen die Möglichkeit, daß vergleichsweise hochaktuelle Stoffe als Stimulantien dienen, deren auslösende Konzentrationen sicherlich in noch niedrigeren Bereichen liegen und damit Langzeituntersuchungen nötig machen. Die Notwendigkeit zu weiteren Untersuchungen kann auf Grund der hohen umweltrelevanten Aktualität dieser Verbindungen nur unterstrichen werden.

Die große Bedeutung der PLA₂ im Zusammenhang mit den verschiedenen pathologischen Erscheinungen rückt Aktivitätsuntersuchungen dieses Enzyms immer mehr in den Vordergrund. Die Palette der Meßmethoden, die bereits in der Literatur beschrieben sind, ist dabei schon recht umfangreich. Je nach Bestimmungsmethode kann man die Tests in verschiedene Gruppen einteilen:

Bis in niedrige Konzentrationsbereiche der zu bestimmenden Substanzen lassen sich Tests verwenden, die auf der vorhergehenden radioaktiven Markierung der Zellipide beruhen. Diese Art von Enzymbestimmung findet sowohl bei Zellextrakten mit extern zugegebener PLA₂ (Lumb et al., 1990 und Meyer et al., 1989) als auch bei ganzen Zellen ihre Anwendung (z.B. Krug, 1992). Bei dieser Art von Bestimmung kann das gesamte Spektrum der Zellipide untersucht werden einschließlich der durch die Enzymreaktion freigesetzten Fettsäure. Die Messungen nach radioaktiver Markierung haben zwar den Vorteil, daß sie vom Ansatz her ein Nachvollziehen natürlicher Verhältnisse ermöglichen, haben jedoch den Nachteil, daß die Höhe der Freisetzung unterschätzt wird. Dies liegt, wie oben erläutert, an der Tatsache, daß freie Fettsäuren mit Hilfe der Lysophospholipidtransferase wieder eingebaut werden. Bei

einer erhöhten Aktivität der PLA₂ kann zwar freie radioaktive Fettsäure gemessen werden, die aber auf Grund des teilweisen Wiedereinbaus nicht der Gesamtmenge entspricht.

Anders verhält es sich bei den eher klassischen Tests. Bei ihnen wird eines der durch die Aktivität entstehenden Endprodukte, Fettsäure bzw. das Lysophospholipid, entweder direkt, wie z. B. durch Einsatz eines mit einer chromophoren Markierung versehenen Substrats, oder indirekt, durch anschließende Modifizierung meßbar gemachter Endprodukte, bestimmt. Beispiele für die direkte Messung bieten die Untersuchungen mittels Gaschromatographie von Ramesha und Taylor, 1991 und die Untersuchungen unter Verwendung chromogener Edukte von Balet et al., 1988, Hendrickson et al., 1990, Radvanyi et al., 1989 und Dagan und Yedgar, 1987. Eine indirekte photometrische Bestimmung wurde von Hirashima et al., 1989 sowie Hoffmann und Neumann, 1989 und Saris und Somerharju, 1989 vorgenommen. Bei den beiden letztgenannten kann, methodisch bedingt, allerdings nur die Gesamtaktivität der beiden Phospholipasen A₁ und A₂ bestimmt werden.

Wittenauer et al., 1984 und Wilton, 1990 verwenden Enzymaktivitätsmessungen, bei denen eine Veränderung der Fluoreszenzintensität der verwendeten Substrate eine Folge der enzymatischen Vorgänge ist.

Alle genannten Enzymtests bis auf die von Krug, 1992 und Dagan und Yedgar, 1987 verwendeten haben den Nachteil, daß sie sich lediglich zur Bestimmung der Aktivität in Zellextrakten bzw. der nicht membranständigen PLA₂ eignen. Als Folge scheidet häufig eine Vitalfärbung und damit kontinuierliche Beobachtungen an der lebenden Zelle aus.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich zwei wichtige Ansatzpunkte:

Zum einen ist immer noch ein großer Bedarf an Untersuchungen zum Turnover von Lipiden in verschiedenen zellulären Systemen vorhanden. Eine zusätzliche Gegenüberstellung von unterschiedlichen Zelllinien erschien dabei wünschenswert. Da in diesem Zusammenhang Fluoreszenzmarkierungen immer mehr in den Vordergrund rücken, war es sinnvoll, deren Vorteile ebenfalls auszunutzen. Gleichwohl sind zur Verknüpfung dieser Ergebnisse mit tatsächlichen Gegebenheiten Untersuchungen mit radioaktiv markierten Lipiden unerlässlich.

Zum zweiten stellt die Aktivitätsbestimmung der PLA₂ ein immer noch nicht zu aller Zufriedenheit gelöstes Problem dar. Daher war im weiteren daran gedacht, auf Grund der Vorkenntnisse über die Aufnahme- und Transportwege innerhalb der zuvor untersuchten zellulären Systeme ein Meßsystem zur kontinuierlichen Bestimmung der zellulären PLA₂-Aktivität zu entwickeln. Ein wichtiger Gesichtspunkt ist dabei die Notwendigkeit der Bestimmung von Aktivitätsveränderungen durch den chronischen Einfluß von Stimulantien, wie sie umweltrelevante Schadstoffe, z.B. die schwermetallorganischen Verbindungen, darstellen. Durch sie bedingt besteht die Notwendigkeit von Langzeitmessungen zum Einfluß niedriger Dosen auf das enzymatische System. Dabei war an eine Bestimmung von fluoreszenzmarkierten, auf Grund der PLA₂-Aktivität freigesetzten Fettsäuren gedacht. Diese Fettsäuren sollten die Eigenschaft besitzen, von der Lysophospholipid-Transferase nicht erkannt zu werden.

Dadurch ist ein Wiedereinbau ausgeschlossen. Somit können auch langanhaltende kleine Aktivitätsänderungen erfaßt werden. Zusammenfassend läßt sich das geplante Bestimmungssystem in folgender Abb. 4 verdeutlichen:

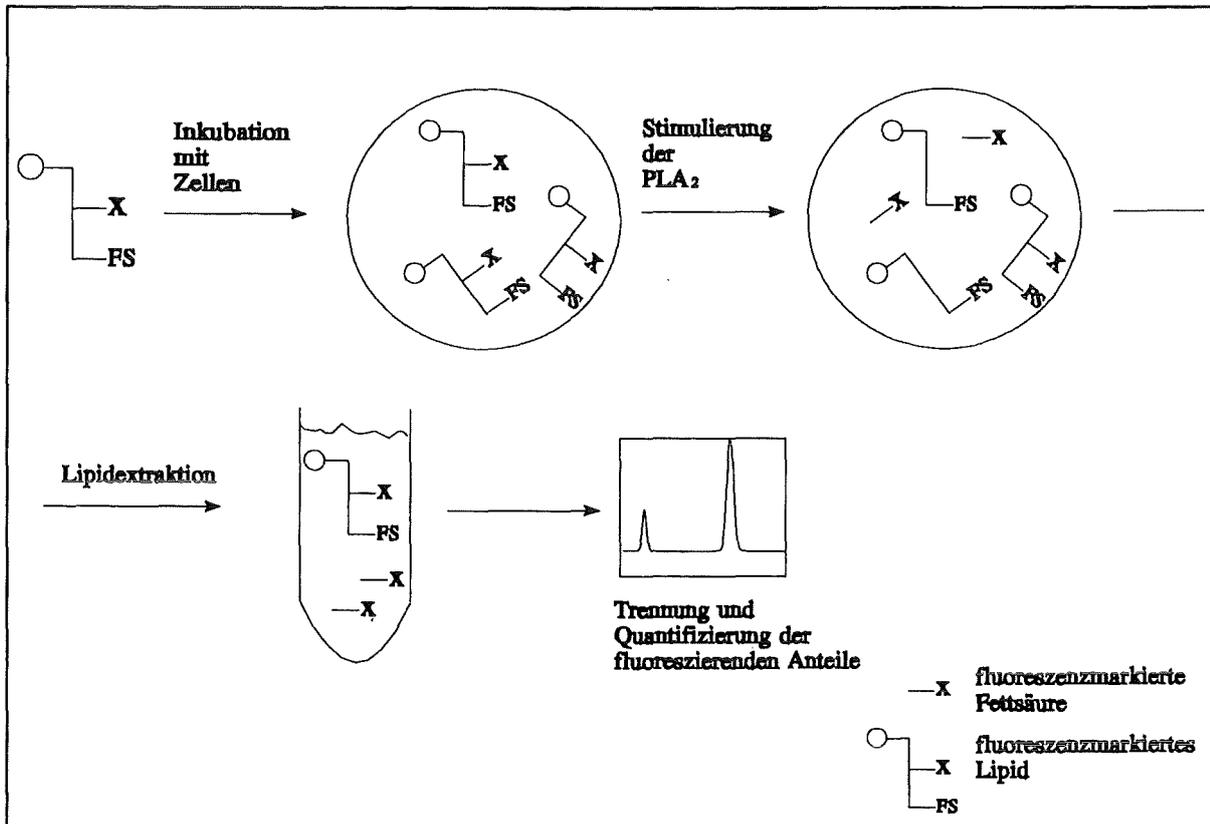


Abb. 4 Schematische Darstellung der geplanten Vorgehensweise zur Aktivitätsbestimmung der Phospholipase A₂

Da für die Ausarbeitung eines Tests Einbau- bzw. Turnover-Untersuchungen notwendig sind, bot es sich an, beide Aspekte miteinander zu verknüpfen. Dies bedeutet auch eine sorgfältige Auswahl der Fluoreszenzmarkierung und der Zellen, da diese eine stimulierbare PLA₂ besitzen müssen.

Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Krug zeigten eben dies bei dem System der Leukozytenzelllinie der HL-60 Zellen. Zudem existieren bereits zahlreiche Untersuchungen zur Stimulierung der zellulären PLA₂ mit Hilfe verschiedener Stimulantien einschließlich der Schwermetalle. Des weiteren wird diese Zelllinie auch an anderer Stelle als geeignet für die Untersuchung des Eicosanoidstoffwechsels betrachtet (Bonser et al., 1981).

Da aus der Literatur von der Gruppe um Pagano bereits Daten über den Turnover von fluoreszenz-, speziell NBD-markierten Lipiden in der V79 Fibroblastenzelllinie des chinesischen Hamsters vorhanden sind, lag es nahe, durch Verwendung von menschlichen primären Fibroblastenzellen den Übergang zwischen den Zelllinien der Hamsterfibroblasten, der menschlichen Fibroblasten und der menschlichen Leukozyten zu wagen. Die in unserem Institut bereits etablierten NFB-Zellen (normal fibroblast) schienen dafür sehr gut geeignet.

Als dritte Zelllinie wurde die Nervenzelllinie der NG-Zellen (Neuroblastoma-Gliomazelllinie NG108-CC15) ausgewählt. Von dieser Zelllinie ist ebenfalls bekannt, daß deren PLA₂ durch verschiedene Stimulantien angeregt werden kann.

Durch Auswahl dieser drei Zelllinien ist die Möglichkeit gegeben, eventuelle zelluläre Unterschiede bei Turnover- und auch Stimulierungsversuchen in einen Kontext zueinander zu bringen. Dadurch lassen sich Zellspezifitäten gegenüber Allgemeingültigkeiten abgrenzen. Zudem können durch Verwendung der NFB-Zellen Vergleiche zwischen Zelllinien und primären Zellen in erster Annäherung gezogen werden.

Bei der Auswahl geeigneter Fluoreszenzmarkierungen lag es nahe, diejenigen näher in Betracht zu ziehen, von denen bereits im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen Erkenntnisse vorlagen. Gerade im Zusammenhang mit dem intrazellulären Transport existieren einige Vergleichsdaten aus der Gruppe um Pagano, die mit (N-[7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexansäure (C_6 -NBD-FS) markierten Lipiden arbeiten. Pyren-markierte Substanzen werden ebenfalls häufiger in der Literatur erwähnt, wobei bei ihnen schon bei manchen zellulären Systemen ein Wiedereinbau nachgewiesen wurde. Für Aktivitätsmessungen der PLA_2 werden auch immer wieder mit 4-(6-Phenyl-1,3,5-hexatrienyl)- β -benzpropansäure (PHTB-FS) markierte Lipide verwendet. Um möglichst physiologische Verhältnisse zu schaffen, schien es zudem ratsam, auch länger-kettige Varianten der Fettsäuren zu testen.

Turnover-Untersuchungen zugegebener Lipide sollten sich auf Grund des Versuchsansatzes vorwiegend auf direkte bzw. indirekte Substrate der PLA_2 beziehen. Daher wurden zunächst Aufnahme- und Umbaubestimmungen unter Verwendung von PC vorgenommen. Vorstufen in der Biosynthese wie PS und PA, sowie PE boten sich ebenfalls an, wobei gerade im Falle der Fluoreszenzmarkierung diese häufig nicht kommerziell erhältlich sind, also hergestellt und verifiziert werden müssen.

Zusammenfassend lassen sich die Ziele der vorliegenden Arbeit folgendermaßen formulieren:

1. Auswahl einer geeigneten Fluoreszenzmarkierung.
2. Untersuchungen zu den Eigenschaften und damit der Handhabbarkeit der mit dieser Fluoreszenzmarkierung versehenen Lipide, sowie die Erarbeitung von Trennmöglichkeiten.
3. Untersuchungen zum Ein- und Umbau dieser zu zellulären Systemen extern zugegebenen fluoreszenzmarkierten Lipide. Hierbei sollte zumindest ein teilweiser Vergleich zu Ergebnissen nach Inkubation mit radioaktiv markierten Lipiden gezogen werden.
4. Untersuchungen zur Veränderung der nach dieser Methode meßbaren Lipidzusammensetzung nach Stimulierung der zellulären PLA_2 .
5. Auf Grund dieser Daten sollte die Verwendbarkeit der benutzten PLA_2 -Aktivitätsmessung diskutiert werden bzw. eine Optimierung des Systems stattfinden.

2 Material und Methoden

In diesem Teil sollen aus Übersichtlichkeitsgründen vorwiegend die in der Liste angegebenen Abkürzungen verwendet werden.

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Handhabung der Zellkulturen

Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf wurden sie im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zum Entfernen des im Einfriermedium enthaltenen DMSO sofort mit ca. 5 ml des jeweils für die Zellen verwendeten Standardmediums bei 100 g für 5 min in der Digifuge GL von HERAEUS, Osterode, abzentrifugiert, nochmals gewaschen und unter den jeweiligen Kultivierungsbedingungen angezogen.

Zum Einfrieren wurden die Zellen im jeweiligen Standardmedium, dem ein Volumenanteil von 10 % DMSO (SERVA, Heidelberg) zum Schutz vor Einfrierschäden zugesetzt war, in der zellspezifischen Konzentration in 1,8 ml Schraubgefäßen (NALGENE, Braunschweig) zunächst für einen Tag in einem Behälter aus Styropor® bei - 80 °C gehalten, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die Zellkulturen wurden in Zellkulturflaschen der Firma GREINER, Frickenhausen, jeweils nach drei bis vier Tagen umgesetzt. Steriles Arbeiten wurde an der Sterilbank Gelaire, ICN BIOMEDICALS durchgeführt. Zur Kultivierung wurden die Zellen in einem Brutschrank Typ *CO₂-Auto-Zero* von HERAEUS, Osterode, bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten.

Alle im folgenden angeführten Standardmedien zur Zellkultur wurden vor dem Erstgebrauch mit Hilfe der Bottle Top Filter (FALCON, Kirchheim / Teck) steril filtriert.

Die Zellzahlbestimmung wurde zum Ansetzen der Zellen nach vorheriger Sichtkontrolle unter dem Auflichtmikroskop (HUND, Wetzlar), bei NG- und NFB-Zellen mit eingeschalteter Phasenkontrasteinrichtung, nach geeigneter Verdünnung mit *Isoton* (DR. MOLTER GmbH, Neckargemünd) mit Hilfe eines Zellzählgeräts (Coulter counter, COULTER ELECTRONICS, Dunstable) durchgeführt.

Vitalitätsbestimmungen wurden nach der Trypanblauausschlußmethode (nach Hanks und Wallace, 1958) durchgeführt. Dazu wurde die Suspensionskultur der HL-60 Zellen in einer 1:1 Verdünnung mit 0,5 %iger Trypanblaulösung der Firma SERVA, Heidelberg (in 0,9 % NaCl-Lösung) angesetzt und mittels der *Neubauer-Zählkammer* unter dem Mikroskop innerhalb von zwei Minuten ausgezählt.

Bei den festsitzenden Kulturen der NG- und NFB-Zellen wurde der Überstand abgenommen, die Zellen kurzzeitig mit der 0,5 %igen Trypanblaulösung überschichtet, anschließend mit PBS (PBS = phosphate buffered saline; 0,14 M NaCl, 0,6 M MgCl₂, 2,7 mM KCl, 0,7 mM CaCl₂, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) einmal gewaschen und die Vitalität qualitativ unter dem Inversmikroskop (LEITZ, Stuttgart; Laborlux 12; Objektiv 10x) bestimmt. Vitale Zellen erscheinen bei dieser Vitalitätsbestimmung ungefärbt, tote dunkelblau.

2.1.2 HL-60 Zellen

Kultur undifferenzierter HL-60 Zellen

Bei HL-60 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die von den Blutkrebszellen einer Frau mit akuter promyelozytischer Leukämie (human leukemic cell line) abgeleitet ist (Collins et al., 1977). Es sind undifferenzierte Zellen, die allerdings ihre sonst normale Entwicklung durch die Einwirkung von Induktoren sowohl in Richtung Makrophagen (Rovera et al., 1979) als auch zu Granulozyten (Collins et al., 1978; Newburger et al., 1979) fortsetzen können. Mit Beginn der Differenzierung stellen sie die Teilungsaktivität nahezu ein.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Zellen verwendet, die aus dem Pharmakologischen Institut in Heidelberg, Gruppe Jakobs, stammen, später Zellen der Firma ATCC, Maryland. Im ersten Fall handelt es sich um Zellen einer Passage ab ungefähr 30, während die Zellen von ATCC ab einer Passage von 20 verwendet wurden. Diese Arbeit betreffende Unterschiede zwischen den beiden Kulturen lagen nicht vor. Nach dem Auftauen wurden die Zellen nur bis zu 15mal passagiert, da sie sich anschließend zumindest in ihren Wachstumseigenschaften veränderten.

Das Standardmedium zur Kultur undifferenzierter HL-60 Zellen setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

450 ml	RPMI 1640 (GIBCO, Eggenstein)
75 ml	FKS (fötales Kälberserum (GIBCO, Eggenstein), hitzeinaktiviert bei 56 °C, 30 min)
7,5 ml	200 mM L-Glutamin
5 ml	MEM 100 (Non essential amino acid von GIBCO, Eggenstein)
5 ml	100 mM Natriumpyruvat
3 ml	Penicillin / Streptomycin (GIBCO, Eggenstein; entspricht 55 IU/ml Penicillin und 55 µg/ml Streptomycin)

Zur Kultivierung wurden die Zellen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen / 20 ml Standardmedium bei einer Füllhöhe von 0,27 cm (dies entspricht bei einer 250 ml Flasche einer Menge von 20 ml Medium) gehalten.

Differenzierung von HL-60 Zellen zu Granulozyten

Die Differenzierung von HL-60 Zellen in Richtung Granulozyten wurde durch Zugabe von 1,3 % DMSO erreicht (Collins et al., 1978, Newburger et al., 1979). Hierzu wurden die benötigten undifferenzierten Zellen bei 100 g in der *Digifuge* abzentrifugiert. Standardmedium entsprechend einer Füllhöhe von 0,57 cm in der Flasche wurde mit 1,3 % DMSO versetzt und $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml Medium darin resuspendiert. (Bei 600 ml Zellkulturflaschen entspricht dies $1 \cdot 10^8$ Zellen in 100 ml Medium mit 1,3 ml DMSO). Die Zellen wurden nach einer Differenzierungsdauer von fünf bis maximal sieben Tagen für Versuche verwendet.

Die Bestimmung des Differenzierungsgrades wurde mit Hilfe der NBT-Methode (Wijermans et al., 1987, in veränderter Form) durchgeführt. Dazu wurden ungefähr $2 \cdot 10^6$ Zellen bei 100 g abzentrifugiert und mit 3 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen, mit 1 ml einer 0,2 %igen NBT-Lösung (NBT = Nitroblautetrazolium; SERVA, Heidelberg; in PBS gelöst) und 10 µl einer Stammlösung von 0,05 mg TPA / ml DMSO (TPA = 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) gemischt und für 25 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 100 g wurden die Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und in der *Neubauer-Zählkammer* unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Differenzierte Zellen können nach Induktion durch z.B. TPA im Unterschied zu undifferenzierten Zellen Formazan reduzieren und bilden dann schwarzblaue Formazan-Ablagerungen. Undifferenzierte Zellen sehen dagegen im Mikroskop hell aus. Der Differenzierungsgrad errechnet sich aus:

$$\% \text{ Differenzierung} = \frac{\text{dunkel gefärbte Zellen}}{\text{Gesamtzahl}}$$

2.1.3 NFB-Zellen

Bei den NFB-Zellen (**n**ormal **f**ibroblast) handelt es sich um eine festsitzende Kultur von Hautfibroblasten eines gesunden Menschen aus einer Münchener Klinik. Sie wurden mir freundlicherweise von Dr. Lücke-Huhle, IGEN, Kernforschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt.

Das Standardmedium für NFB-Zellen setzte sich folgendermaßen zusammen:

450 ml	Dulbecco (GIBCO, Eggenstein)
100 ml	FKS (ohne Hitzeinaktivierung)
3 ml	Penicillin / Streptomycin (GIBCO, Eggenstein; entspricht 55 IU/ml Penicillin und 55 µg/ml Streptomycin)

Zum Umsetzen mußten die Zellen mit 0,25 %igem Trypsin für fünf Minuten behandelt werden, um sie vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen in 10 ml Standardmedium pro 250 ml Zellkulturflasche weitergezogen.

2.1.4 NG108-CC15-Zellen

NG-Zellen sind Zellen einer Zellhybridlinie aus Neuroblastomazellen der Maus und Gliomazellen der Ratte (Hamprecht, 1974). Die hier verwendeten Zellen stammen aus dem Pharmakologischen Institut in Heidelberg, Gruppe Jakobs.

Das Standardmedium für diese Zellen setzte sich hierfür aus folgenden Bestandteilen zusammen (nach Hamprecht et al., 1985):

450 ml	RPMI 1640
6,5 ml	HAT (6,8 mg Hypoxanthin ($\hat{=}$ 1 mM), 0,12 mg Aminopterin ($\hat{=}$ 0,27 mM), 2,45 mg Thymidin ($\hat{=}$ 20 mM)); Firma SIGMA, München
50 ml	FKS (ohne Hitzeinaktivierung)
7,5 ml	200 mM L-Glutamin
2,5 ml	Penicillin / Streptomycin (GIBCO, Eggenstein; $\hat{=}$ 55 IU/ml Penicillin und 55 μ g/ml Streptomycin)

Bei dieser Nervenzelllinie handelt es sich ebenfalls um ein festsitzende Kultur, deren Zellen mit 0,25 %igem Trypsin behandelt werden müssen, um sie anschließend in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml Standardmedium in 250 ml Zellkulturflaschen weiterzuziehen.

2.2 Lipide

2.2.1 Extraktion der Lipide

Alle zum Lösen, Extrahieren, Trennen bzw. Überschichten von Lipiden benötigten Lösungsmittel wurden von der Firma MERCK bezogen.

Das Eindampfen lipidhaltiger Lösungen wurde unter Stickstoffstrom bei 37 °C mit Hilfe des TCS-Metallblock-Thermostaten (LABOR TECHNIK BARKEY; Bielefeld) vorgenommen.

Die Extraktion von Lipiden wurde mit Hilfe einer Methode nach Bligh und Dyer, 1959 durchgeführt: Alle Extraktionsschritte wurden unter Kühlung mit Eis durchgeführt. Zunächst wurde die wässrige Suspension in ein Glasröhrchen überführt, in dem das 1,25fache Volumen an Chloroform vorgelegt war. Durch Zufügen des 2,5fachen Volumens an Methanol bildete sich eine Phase. Weiteres Hinzufügen des 1,25fachen Volumens sowohl an Chloroform als auch 0,02 %iger Ameisensäure und leichtes Schwenken des Röhrchens führte nach zehnmütigem Stehenlassen bei Eiskühlung zu einer guten Phasentrennung, wobei Lipide in der unteren, organischen Phase enthalten waren. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 350 g in der *Digifuge* konnte die untere Phase leicht herauspipettiert und in ein Glasröhrchen überführt werden, so daß ein Eindampfen der organischen Phase unter Stickstoffstrom vorgenommen werden konnte. Zur Lagerung wurde der Lipidextrakt in ca. 100 μ l Chloroform aufgenommen, mit Stickstoff überschichtet und bei -20 °C aufbewahrt.

Die wässrige Phase wurde bei der Extraktion radioaktiv markierter Lipide vor der Aktivitätsbestimmung unter dem Abzug für 24 Stunden stengelassen, um verbliebene Reste von Chloroform zu entfernen. Bei der Extraktion fluoreszenzmarkierter Lipide wurde diese Phase verworfen, da durch Quencheffekte des Wassers eine Messung der Fluoreszenz nicht möglich war.

2.2.2 Radioaktiv markierte Lipide

Die radioaktiv markierten Lipide waren bei der Firma AMERSHAM, Braunschweig, kommerziell erhältlich. Formeln, Namen und die im weiteren benutzten Abkürzungen der verwendeten Lipide sind in Abb. 5 gezeigt.

2.2.2.1 Trennung der radioaktiv markierten Lipide

Zur Trennung der radioaktiv markierten Lipide wurde der eingedampfte Lipidextrakt in Chloroform aufgenommen und auf eine Dünnschichtplatte (Polygram Sil G, Schichtdicke 0,25 mm, MACHEREY-NAGEL, Düren), die vorher gesäubert (Vorlaufmittel: Chloroform : Methanol [2 : 1]) und aktiviert war (30 Minuten bei 110 °C), aufgetragen. Als Laufmittel wurde nach Krug (in Vorbereitung) ein Gemisch von Chloroform : Methanol : Essigsäure : Wasser [56 : 33 : 9 : 2] bis zu einer Laufmittelfront von 13 cm ab Boden und für die restliche Trennung nach kurzer Trocknung mittels Fön ein Laufmittel bestehend aus Hexan : Diethylether : Essigsäure [80 : 20 : 1] verwendet. Im ersten Laufmittel trennten sich Phospholipide auf, während Neutrallipide, freie Fettsäuren und deren Metabolite mit der Laufmittelfront liefen und im zweiten Laufmittel getrennt wurden. Anschließend wurde die Dünnschichtplatte in eine Jodkammer gestellt. Jod addiert reversibel an C=C-Doppelbindungen, so daß die entstehenden gelb-braunen Flecke in diesem Fall die Lage der Lipide anzeigen und mit dem Bleistift markiert werden können. Anschließend wurde die Dünnschichtplatte auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm von AMERSHAM, Braunschweig) aufgelegt und in einer lichtdichten Kassette je nach Aktivität zwischen vier Tagen und drei Wochen bei -20 °C exponiert. Bei ³H-Aktivität war eine vorherige Behandlung mit Verstärker-Spray (Enhancer-Spray, NEN, Boston) notwendig.

2.2.2.2 Quantifizierung der radioaktiv markierten Lipide

Nach Entwicklung der Autoradiographie wurden die Plattenteile mit den radioaktiv markierten Banden der Dünnschichtchromatographie ausgeschnitten, in Szintillationsgefäße (Minis 2000, ZINSSER ANALYTIC, Frankfurt) überführt, 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, ZINSSER ANALYTIC) hinzugefügt und nach kurzem Schütteln und anschließendem 30minütigen Stehenlassen die Aktivität mit dem Flüssigszintillationszähler (1219 Rackbeta, LKB, Freiburg) bestimmt.

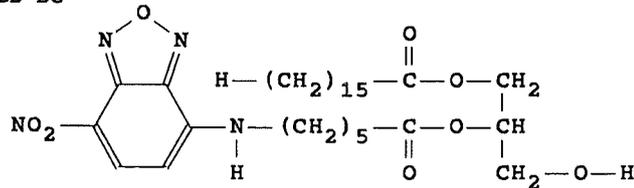
Die Verifizierung der Lipide geschah über einen Vergleich der R_f-Werte mit denen von Standardsubstanzen.

2.2.3 Fluoreszenzmarkierte Lipide

Formeln, Namen und die im weiteren benutzten Abkürzungen der verwendeten fluoreszenzmarkierten Lipide sind in Abb. 6a und Abb. 6b gezeigt.

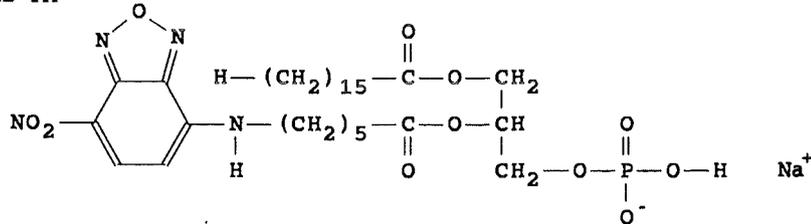
1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl-*sn*-glycerin

= C₆-NBD-DG



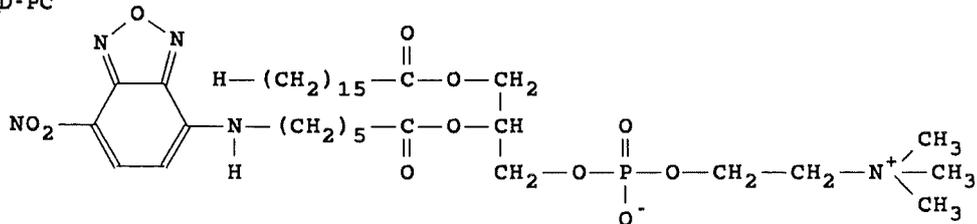
1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphat, Natriumsalz

= C₆-NBD-PA



1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin

= C₆-NBD-PC



1-Palmitoyl-2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])aminohexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserin, Natriumsalz

= C₆-NBD-PS

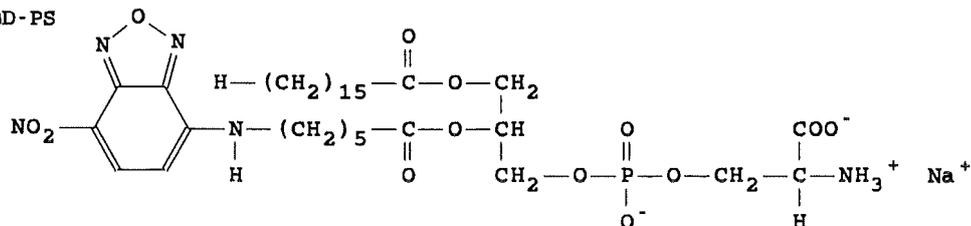
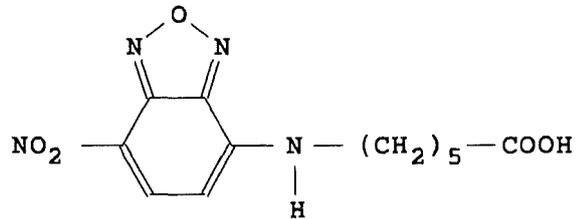


Abb. 6a Formeln der verwendeten fluoreszenzmarkierten Lipide (1. Teil). Die im Text verwendeten Abkürzungen sind unterhalb der jeweiligen Namen angeführt.

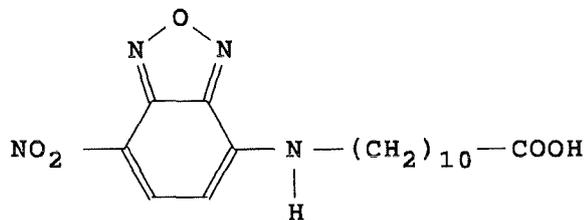
(N-[7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])-aminohexansäure

= C₆-NBD-FS



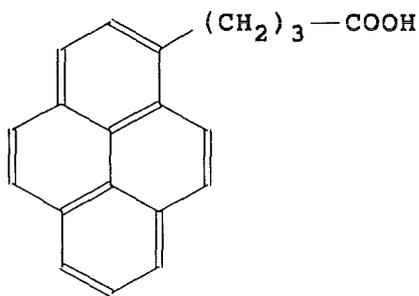
(N-[7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl])-aminoundecansäure

= C₁₁-NBD-FS



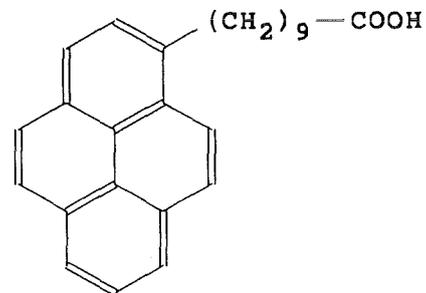
4-(1-Pyren)-buttersäure

= 4-Pyren-FS



10-(1-Pyren)-decansäure

= 10-Pyren-FS



4-(6-Phenyl-1,3,5-hexatrienyl)-β-benzpropansäure

= PHTB-FS

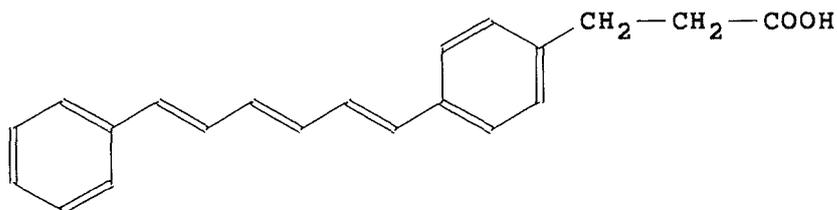


Abb. 6b Formeln der verwendeten fluoreszierenden Lipide (2. Teil). Die im Text verwendeten Abkürzungen sind unterhalb der jeweiligen Namen angeführt.

2.2.3.1 Erstellen von Emissions- und Exzitationsspektren

Diese Spektren wurden am Lumineszenzspektrometer LS-5B (PERKIN-ELMER, Beaconsfield, England) erstellt. Bei der Untersuchung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff NBD markierten Lipide wurde auf Grund von Vortests bei Emissionsspektren eine Anregungswellenlänge von 470 nm gewählt, bei Exzitationsspektren die Intensität der Emission bei 525 nm gemessen.

2.2.3.2 Trennung und Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Lipide

Alle Lipide wurden nach Isolierung durch die in 2.2.1 beschriebene Extraktion getrennt. Eine Quantifizierung der Lipide wurde lediglich nach Trennung mit Hilfe der HPLC durchgeführt.

Für die Trennung wurden folgende Methoden verwendet:

Dünnschichtchromatographische Trennung

Die Trennung mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde nach Struck und Pagano, 1980 durchgeführt. Dazu wurden die Lipide auf Dünnschichtplatten ohne Bindemittel (POLYGRAM SIL N-HR, MACHEREY-NAGEL, Düren), die vorher gesäubert (Vorlaufmittel: Chloroform : Methanol [2 : 1]) und aktiviert waren (30 Minuten bei 110 °C), aufgetragen und in einem Laufmittel der Zusammensetzung Chloroform : Methanol : 25 %iger Ammoniaklösung [65 : 35 : 5] getrennt. Qualitative Untersuchungen wurden durch Betrachten der Platten unter UV-Licht bei 350 nm (Universal UV-Lampe, CAMAG, Berlin) durchgeführt. Längeres Aufbewahren war nach Einschweißen der Platten in Kunststoffolie und Lagerung bei -20 °C möglich. Zum Archivieren der Ergebnisse wurden die Platten unter UV-Licht fotografiert.

Festphasenseparation mit Hilfe von C18-Säulen

Für diese Trennung wurden SEP-PAK C18 Cartridges (WATERS MILLIPORE, Eschborn) verwendet. Die Trennung geschah nach folgendem Schema:

3 ml	Isopropanol	(Konditionieren der Säule)
100 µl	Chloroform mit der darin gelösten Probe	(Auftragen der Probe)
1,5 ml	Hexan : Methyltertiärbuthylether (MTBE) : Essigsäure [50 : 50 : 1]	(Extraktion von C ₆ -NBD-FS)
0,75 ml	MTBE : Essigsäure [100 : 2]	(Zwischenfraktion)
2 ml	MTBE : Methanol : 25 %iger Ammoniaklösung [10 : 4 : 1]	(Extraktion von C ₆ -NBD-PC)

Alle Fraktionen wurden unter Stickstoffstrom eingedampft und die Fluoreszenz in Angaben von relativen Einheiten mit Hilfe des Lumineszenzspektrometer LS-5B (PERKIN-ELMER, Beaconsfield, England) bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm gemessen.

Trennung mit Hilfe von HPLC

Für diese Art der Trennung und Quantifizierung der mit dem Fluoreszenzfarbstoff NBD markierten Lipide und der C_6 -NBD-Fettsäure stand eine HPLC-Anlage von WATERS, Eschborn, und die dazugehörige Auswertesoftware zur Verfügung. Im einzelnen setzte sich die Anlage wie folgt zusammen: ein Hochdruckpumpengradientensystem mit zwei Pumpen (510 HPLC-pump), ein manueller Injektor (U6K) bzw. gegen Ende der Arbeit ein automatischer Probeninjektor (712 Wisp), ein Fluoreszenzdetektor (Scanning Fluorescence Detector 470), sowie ein Steuer- und Auswertesystem, bestehend aus einem System Interface Module und einem Personal Computer mit der Auswertesoftware Maxima 820, Version 3.3.

Zur Trennung mittels Reversed Phase Chromatography wurde eine C8-Stahlsäule, Partikelgröße $5\ \mu\text{m}$ (CS CHROMATOGRAPHIE SERVICE GmbH, Langerwehe) verwendet. Die Auftrennung wurde durch einen Lösungsmittelgradienten bewirkt, der aus Wasser (HPLC-reines Wasser aus der Hochreinwasseranlage Milli-Q, MILLIPORE, Eschborn) und steigender Konzentration an Methanol (HPLC-rein, PROMOCHEM GmbH, Wesel) bestand. Beide Laufmittel wurden vor ihrer Verwendung filtriert (verwendete Filter waren Durapore HVLP bzw. MF HAWP, beides MILLIPORE, Eschborn) und dabei gleichzeitig entgast. Die Dauer zur Trennung betrug bei beiden verwendeten Gradienten 19 Minuten. Bei der Trennung von C_6 -NBD-PS wurde ein Durchfluß von $1,5\ \text{ml/min}$ eingestellt, bei der im allgemeinen verwendeten Trennung $1,4\ \text{ml/min}$. Chromatogramme der beiden verwendeten Trennungen sind in Abb. 7 gezeigt.

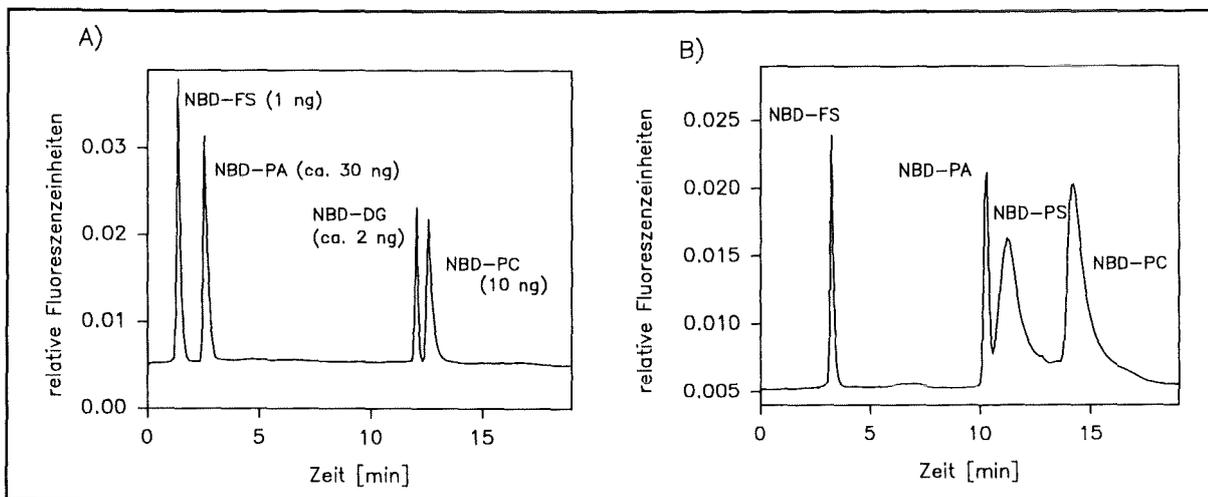


Abb. 7 HPLC-Chromatogramme zur Trennung von Lipiden, die mit dem Fluorophor C_6 -NBD markiert sind.
 A) HPLC-Chromatogramm zur Trennung von C_6 -NBD-FS, C_6 -NBD-PA, C_6 -NBD-DG und C_6 -NBD-PC. Es wurde mit einem Volumenanteil von 31 % Wasser begonnen.
 B) HPLC-Chromatogramm zur Trennung von C_6 -NBD-PS von den anderen Lipiden. Es wurde mit einem Volumenanteil von 50 % Wasser begonnen.

Zur Quantifizierung der fluoreszierenden Lipide wurden deren Peakflächen im Chromatogramm berechnet, diese zueinander ins Verhältnis gesetzt, oder, falls eine Standardsubstanz vorhanden war, daraus die absolute Menge berechnet.

2.2.3.3 Herstellung und Reinigung der nicht kommerziell erhältlichen Lipide

A) Herstellung von C_6 -NBD-DG (nach Comfurius und Zwaal, 1977)

Hierzu wurde von 0,7 μ g in Chloroform gelöstem C_6 -NBD-PC das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom entfernt, 1,5 ml Puffer (0,1 M Acetatpuffer mit 0,1 M $CaCl_2$) und 140 U Phospholipase C von *Clostridium perfringens* (SIGMA, München) hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C im Wasserbad für 15 Minuten gerührt.

B) Herstellung von C_6 -NBD-PA

Diese Substanz wurde in gleicher Weise wie C_6 -NBD-DG hergestellt, allerdings unter Einwirkung von 150 U Phospholipase Γ von *Streptomyces chromofuscus* (SIGMA, München).

C) Herstellung von C_6 -NBD-PS (nach Comfurius et al., 1990)

Für dessen Herstellung wurde von 0,5 mg in Chloroform gelöstem C_6 -NBD-PC das Lösungsmittel unter Stickstoffstrom abgedampft, 40 mg 1-O-Octyl- β -D-glucopyranosid (SIGMA, München) und 1 ml Puffer (0,1 M $CaCl_2$, 0,1 M Natriumacetat) mit 0,5 g gefriergetrocknetem Serin (SIGMA, München), sowie 31,2 U Phospholipase D von *Streptomyces species* (SIGMA, München) dazugegeben und für fünf Minuten bei 45 °C im Wasserbad unter Rühren inkubiert.

D) Herstellung von C_6 -NBD-PE

Die Herstellung dieser Substanz wurde wie die des C_6 -NBD-PS vorgenommen, wobei statt Serin 0,5 ml Ethanolamin (SIGMA, München) dazugegeben wurde.

Nach ihrer Herstellung wurden die Lipide durch Lipidextraktion (siehe 2.2.1) isoliert und mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie von unerwünschten Produkten getrennt. Die Isolierung von der Dünnschichtplatte geschah durch ein modifiziertes Verfahren der oben beschriebenen Lipidisolierung: Der Plattenteil mit der gewünschten Bande wurde ausgeschnitten und in einer Lösung aus 1 ml PBS, 1,25 ml Chloroform und 2,5 ml Methanol so lange bei 37 °C im Wasserbad gerührt, bis die gesamte Fluoreszenz sichtbar in die Lösung übergetreten war. Dies dauerte je nach Substanz zwischen 10 Minuten und 1,5 Stunden. Anschließend wurde 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml 0,02 %ige Ameisensäure hinzugefügt und die Lipide wie oben beschrieben isoliert. Um kleine Plattenstücke abzutrennen, wurde die abpipettierte Lösung nochmals bei 700 g zentrifugiert.

2.2.3.4 NMR-Spektroskopie¹

Zur Verifizierung der hergestellten Lipide wurden sowohl Protonen- als auch Phosphorspektren mit ^{31}P erstellt. Als Geräte standen dabei das AMX 360 bzw. das ARX 500 der Firma BRUKER zur Verfügung. Die Anregungsfrequenzen für die Protonenspektren lagen entsprechend bei 360 bzw. 500 MHz. Die Phosphorspektren wurden am AMX 360 erstellt, wobei die Anregungsfrequenz bei 145,78 MHz lag.

¹ Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Ackermann, Firma BRUKER, Rheinstetten durchgeführt, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

Die Protonenspektren wurden sowohl als 1-dimensionales Spektrum, als auch als 2-D Spektrum mit Hilfe der **Total Correlation Spectroscopy (TOCSY)** erstellt.

Die Meßzeit bei den 1-D Spektren betrug ungefähr 10 min, bei 2-D Spektren wegen der geringen Substanzmengen 8 Stunden und bei 1-D Phosphorspektren 3,5 bis 4 Stunden.

2.2.4 Herstellung von Vesikeln

Die Herstellung der Vesikel verlief je nach Markierung unterschiedlich. Zunächst wurde den in Chloroform gelösten fluoreszenzmarkierten Lipiden unter Stickstoffstrom in lösungsmittelbeständigen Kunststoffröhrchen (SARSTEDT, Nümbrecht) das Lösungsmittel entzogen. Da Calciumionen und Magnesiumionen die Vesikelbildung beeinflussen können (Oates et al., 1982), ist zur Darstellung der Vesikel calcium- und magnesiumfreies PBS als Medium verwendet worden. Die Anordnung als Vesikel bzw. Doppelmembranen wurde durch Ultraschall hervorgerufen (nach Huang und Charlton, 1972). Dazu wurden die mit 1 bis 2 ml PBS ohne Calcium und Magnesium überschichteten Lipide mit dem Ultraschallgerät Sonifier Cell Disruptor B15 (BRANSON, Schwäbisch Gmünd) bei der Einstellung *Dutycycle 60 %*, *Outputcontrol 6* für 30 Sekunden behandelt.

Da sich Vesikel normalerweise durch Eintrag nativer Lipide in wässrigem Medium bilden (Ostro, 1987), wurden die radioaktiv markierten Lipide nach dem Eindampfen des Lösungsmittels unter Stickstoffatmosphäre in DMSO aufgenommen und in wässriges Medium überführt.

2.2.5 Untersuchungen zur Stabilität der Lipide in verschiedenen Inkubationsmedien

Zur Wahl der richtigen Zellinkubationsmedien wurden verschieden markierte Lipide mit unterschiedlichen Medien inkubiert. In Bezug auf das fluoreszierende Lipid C₆-NBD-PC wurden sowohl FKS-haltige als auch Medien, die die synthetischen FKS-Ersatzstoffe CPSR-1 (SIGMA, München) bzw. Ultrosor G (GIBCO, Eggenstein) enthielten, getestet. Als FKS-freies Medium wurde demgegenüber das Inkubationsmedium für HL-60 Zellen (s. 2.3) getestet.

Vesikel wurden hierzu gemäß der im Zellversuch verwendeten Inkubationsdauer und mit dem entsprechenden Inkubationsmedium im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Lipide durch Lipidextraktion (s. 2.2.1) extrahiert. Fluoreszenzmarkierte Lipide wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt und qualitativ untersucht. Radioaktiv markierte Lipide wurden wie in 2.2.2.1 beschrieben über Dünnschichtplatte getrennt und quantitativ nach Messung im Flüssigszintillationszähler ausgewertet.

2.2.6 Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten von C₆-NBD-PC und C₆-NBD-FS in Abhängigkeit von Substanz und Lösungsmittel

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Substanz wurden die Intensitäten unterschiedlicher Konzentrationen beider Substanzen mit Hilfe der HPLC bestimmt und einander gegenüber gestellt.

Eine Bestimmung in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel wurde nach Eindampfen gleicher Mengen der jeweiligen gelösten Substanz und Aufnahme in verschiedenen Lösungsmitteln vorgenommen. Die qualitative Bestimmung geschah mit Hilfe des Lumineszenzspektrometer LS-5B (PERKIN-ELMER, Beaconsfield, England).

2.2.7 Untersuchung zum Abbau von C₆-NBD-PC durch externe PLA₂

Um zu testen, inwiefern sich C₆-NBD-PC als artifizielles Lipid überhaupt durch PLA₂ abbauen läßt, wurde PLA₂ von Schweinepankreas extern zu C₆-NBD-PC Vesikeln dazugegeben. Dazu wurde eine 5 µM Lösung von C₆-NBD-PC in Chloroform eingedampft und in Puffer aufgenommen. Der Puffer bestand aus 50 mM Hepes und 25 mM Calciumchlorid in 1 l Wasser. Anschließend wurde die Probe für eine Minute mit dem Ultraschallgerät behandelt. 10 Units PLA₂ (SIGMA, München) wurden zugegeben und die Probe bis zu 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Von abgenommenen Proben wurden die Lipide extrahiert, eingedampft und für eine qualitative Aussage über Dünnschichtplatte getrennt.

2.3 Zellversuche

Zur Inkubation von Zellen mit Lipiden wurde ausschließlich Inkubationsmedium verwendet.

Inkubationsmedium (angelehnt an Bottenstein und Sato, 1979):

500 ml	Standardmedium ohne FKS und ohne Phenolrot
2,5 mg	Insulin (SIGMA, München)
25 mg	menschliches Transferrin (SERVA, Heidelberg)
500 µl	einer Na ₂ SeO ₃ -Stammlösung mit 52 ng/ml (Substanz von SIGMA, München)

Bei NG-Zellen wurde dieses Medium noch ergänzt durch:

100 µl	einer Progesteron-Stammlösung mit 63 µg/ml (Substanz von SIGMA, München)
1,61 mg	Putrescin (SIGMA, München)

Bei Langzeitversuchen mit HL-60 Zellen und radioaktiv markierten Lipiden war aus Gründen der Vitalität der Zusatz von mindestens 3,3 % FKS erforderlich.

Verwendete Zellkulturflaschen und Petrischalen stammten von der Firma GREINER, Frickenhausen.

2.3.1 Inkubation der Zellen mit radioaktiv markierten Lipiden

Zellinkubationen mit radioaktiv markierten Lipiden und anschließende Untersuchungen wurden ausschließlich an undifferenzierten bzw. differenzierten HL-60 Zellen vorgenommen.

Um die Aktivität von Membranenzymen, die die einzuschleusenden Lipide bereits abbauen könnten (Pagano, persönliche Mitteilung bei der DGZ in Bremen, 1989) möglichst gering zu halten, wurde die Inkubation vorsichtshalber bei Eiskühlung bzw. im Kühlschrank bei +4 °C durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen auch vorher im Kühlschrank abgekühlt, was die Vitalität nicht beeinflusste.

Pro geplanten Versuchsansatz wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen in der gekühlten Zentrifuge *Cryofuge 6-6* (HERAEUS, Osterode) bei 100 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit Inkubationspuffer gewaschen und in 10 ml Inkubationspuffer aufgenommen, dem die lösungsmittelfreie, in DMSO (entsprechend 1,3 %) aufgenommene Radioaktivitätsmenge zugefügt war. Die Aufnahme der Lipide fand während der einstündigen Inkubation im Kühlschrank statt. Bei Versuchen mit radioaktiv markiertem Phosphatidylcholin wurde an dieser Stelle mit Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen in 2 ml Inkubationspuffer auf Petrischalen mit 3,1 cm Durchmesser angesetzt und im Brutschrank inkubiert (Zeitpunkt 0).

2.3.2 Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Vesikeln

Bei diesen Versuchsansätzen wurden HL-60 Zellen entsprechend dem Verfahren mit radioaktiv markierten Vesikeln zunächst abgekühlt, bevor pro geplanten Versuchsansatz $2 \cdot 10^7$ Zellen in der gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit Inkubationspuffer gewaschen und in einem Gemisch von 10 ml Inkubationsmedium, dem die Vesikel zugesetzt waren, aufgenommen und für eine Stunde im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren und Waschen wurden die Zellen, in einer Konzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen in 2 ml Inkubationspuffer pro Versuchsansatz auf Petrischälchen mit 3,1 cm Durchmesser verteilt und im Brutschrank inkubiert (Zeitpunkt 0).

NG- und NFB-Zellen wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 3,5 bis 4 ml Standardmedium ausgesät. Um eine Voraktivierung zu vermeiden, wurde das Medium am Abend des darauffolgenden Tages gegen Inkubationsmedium ausgetauscht. Am nächsten Morgen wurde nochmals gegen 2,5 ml frisches Inkubationsmedium ausgetauscht, welchem die Vesikel zugesetzt waren. Da sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte, daß sich gerade die NG-Zellen nach Inkubation im Kühlschrank bei längerer anschließender Untersuchungsdauer von der Petrischale ablösen, wurde die einstündige Inkubation hierfür bei Zimmertemperatur und Dunkelheit durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Inkubationspuffer gewaschen und anschließend mit 2 ml Inkubationsmedium im Brutschrank inkubiert (Zeitpunkt 0).

2.3.3 Bestimmung der aufgenommenen Lipidmengen

Aufnahme radioaktiv markierter Lipide

Zur Überprüfung der Aufnahme radioaktiv markierter Lipide wurde, nach Resuspendieren der Zellen in der vesikelhaltigen Inkubationslösung (A), aus dem Überstand nach dem Inkubieren und dem ersten Abzentrifugieren (B) und aus der Waschlösung (C) jeweils ein Aliquot entnommen und die Aktivität pro Volumeneinheit durch Messung im Flüssigszintillationszähler unter Einbeziehung der Volumina bestimmt.

Folgende Ansatzpunkte zur Berechnung waren daraufhin möglich:

1. Die Gesamtmenge eingesetzter Radioaktivität wurde in Relation gesetzt zu der Menge an Radioaktivität, die im Versuch bei den einzelnen Schritten gemessen wurde.

Die im Laufe des Versuchs gemessene Zählrate ist die Summe der Zählraten aus:

- dem Überstand nach dem Inkubieren und dem ersten Abzentrifugieren (B)
- der Waschlösung (C)
- den wasserlöslichen Zellbestandteilen, die sich im wässrigen Rest, der bei der Lipidextraktion entsteht, wiederfinden lassen (D).
- den Zelllipiden (E)

Somit berechnete sich die Ausbeute aus der Relation von A zu (B+C+D+E).

2. Bei dieser Berechnung wurde das Verhältnis der Gesamtaktivität zur tatsächlich in den Zellen vorhandenen Aktivität gesetzt (A zu (A-B-C)).
3. Hierbei wurde der Quotient aus Gesamtaktivität zu Aktivität in den Zelllipiden gebildet (A zu E).

Aufnahme fluoreszenzmarkierter Lipide

Zur Berechnung der Aufnahme fluoreszenzmarkierter Lipide wurde vor der Inkubation der Zellen in der vesikelhaltigen Lösung (A), aus dem Überstand nach der Inkubation (B) und aus der Waschlösung (C) jeweils ein Aliquot entnommen und die Aufnahme nach Lipidextraktion durch Messung mit dem Lumineszenzspektrometer LS-5B (PERKIN-ELMER, Beaconsfield, England) unter Einbeziehung der Volumina bestimmt (Verhältnis A zu (A-B-C)). Diese Berechnung entspricht derjenigen unter 2.3.3 Punkt 2. angeführten für die Aufnahmeberechnung radioaktiv markierter Lipide.

2.3.4 Turnover-Untersuchungen

2.3.4.1 Turnover-Untersuchungen fluoreszierender Fettsäuren in Zellkulturen

Hierzu wurden die Zellen entsprechend 2.3.2 mit fluoreszierenden Fettsäuren, die wie in 2.2.4 beschrieben, vorbereitet waren, inkubiert. Bei Inkubationen von HL-60 Zellen, die länger als 3 Stunden dauerten, wurde dem Medium 3,3 % FKS zugesetzt. Nach der jeweiligen Inkubationsdauer wurde der Überstand entweder direkt (bei NG- und NFB-Zellen) oder bei HL-60 Zellen nach Zentrifugation abge-

nommen. Anschließend wurden die Lipide extrahiert. Die Turnover-Messung der C₆-NBD-FS geschah mittels HPLC, die anderer fluoreszierender Fettsäuren mittels Dünnschichtchromatographie.

2.3.4.2 Turnover-Untersuchungen markierter Lipide in Zellkulturen

Zur Untersuchung des Turnovers verschieden markierter Lipide in Zellen unterschiedlicher Zelllinien wurden die Zellen zunächst mit den Vesikeln inkubiert und ggf. gewaschen (s. 2.3.1 und 2.3.2).

Zu den Abnahmezeiten wurden bei HL-60 Zellen Zellen und Überstände durch Zentrifugation der abgekühlten, in Glasröhrchen überführten Zellen bei 100 g in der gekühlten Zentrifuge *Cryofuge 6-6* getrennt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Lipide der Zellen und Überstände extrahiert.

Bei NG- bzw. NFB-Zellen konnte der Überstand nach Abkühlen der Zellen in den Petrischalen direkt in das mit Chloroform und Methanol vorgelegte Zentrifugenröhrchen aus Glas überführt werden. Die Zellen wurden mit 0,5 ml PBS überschichtet, mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein zweites Gläschen überführt. Petrischale und Gummischaber wurden mit dem zur Lipidextraktion benötigten Methanol gewaschen.

Anschließend wurden die Lipide der Extrakte nach den jeweiligen Verfahren getrennt und die einzelnen Lipide quantifiziert.

2.3.5 Versuche zur Stimulierbarkeit der zellulären PLA₂ mit verschiedenen aktivierenden Substanzen

Wie in der Einleitung beschrieben, läßt sich die zelluläre PLA₂ durch viele Reagenzien stimulieren. In der vorliegenden Arbeit wurden davon das Calciumionophor A23187, Bradykinin, Melittin und die schwermetallorganischen Verbindungen Triethylbleichlorid und Dibutylzinndichlorid verwendet bzw. getestet.

Die Ansätze waren bei diesem Versuchsaufbau entsprechend den in 2.3.4.2 beschriebenen. In DMSO gelöstes Ionophor (SIGMA, München) wurde den markierten Zellen in einer Konzentration von 10 - 15 µM zugefügt. Die Einwirkzeit betrug 15 min bei HL-60 Zellen und 30 min bei NG- und NFB-Zellen. Bradykinin (SERVA, Heidelberg) wurde in einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml zugefügt und wirkte 1 Stunde auf NG- bzw. NFB-Zellen ein. Melittin (SIGMA, München) wurde in einer Endkonzentration von 5 µg/ml verwendet. Es wirkte auf NG- bzw. NFB-Zellen 20 Minuten ein. Triethylbleichlorid (VENTRON ALPHA PRODUCTS, Karlsruhe) wurde bei Kurzzeitinkubationen in einer Konzentration von 100 µM bis 1 mM eingesetzt, bei Langzeitversuchen in einer von 750 nM. Dibutylzinndichlorid (VENTRON ALPHA PRODUCTS, Karlsruhe) wurde nur für Langzeitinkubationen verwendet und zwar bei einer Konzentration von 750 nM.

Anschließend wurden die Lipide entsprechend den Turnover-Versuchen extrahiert (s. 2.2.1).

2.4 Mikroskopische Untersuchungen

Für die Untersuchung von Zellen war eine vorbereitende Kultivierung der festwachsenden Zellkulturen entweder auf Deckgläschen oder auf Membraneinsätzen erforderlich.

Die Deckgläschen (24 x 24 mm) wurden durch Aufbewahrung in 100 % Ethanol und anschließendem Abflammen sterilisiert, bevor sie in die Mehrfach-Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen à 35 mm Durchmesser (GREINER, Frickenhausen) gelegt wurden. Die Zellen wurden darin jeweils in einer Konzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml Standardmedium für zwei Tage kultiviert.

Für die Kultivierung auf Membraneinsätzen wurde die gleiche Zellzahl verwendet. Die Membraneinsätze (Cell Culture Insert, Durchmesser 25 mm, Porengröße 45 µm, FALCON, Kirchheim / Teck) wurden in die oben beschriebenen Mehrfach-Zellkulturschalen gelegt, wobei zum Schutz vor Austrocknung 2 ml Standardmedium vorgelegt war. Die Zellen wurden auf die Membranen pipettiert.

2.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Durchlichtmikroskop

Für diese Untersuchungen wurden die in Suspensionskultur lebenden HL-60 Zellen in eine *Neubauer-Zählkammer* gegeben, die mit einem normalen dünnen Deckgläschen überdeckt war.

NG- sowie NFB-Zellen wurden wie in 2.4 beschrieben auf Deckgläschen angezogen. Nach Färbung der Zellen in diesen Schälchen wurden die Deckgläschen entnommen, mit PBS abgespült und zum Betrachten der Zellen umgekehrt auf eine *Neubauer-Zählkammer* gelegt. Der Kammerinhalt war jeweils mit PBS gefüllt.

Die Vesikel wurden wie in 2.2.4 beschrieben hergestellt, mit etwas Inkubationsmedium aufgenommen, direkt auf einen Objektträger getropft und mit einem Deckgläschen überdeckt.

Die Untersuchungen wurden an dem Durchlichtmikroskop Laborlux 12 mit Fluoreszenzeinrichtung (LEITZ, Stuttgart) mit dem Filterblock I2 (Anregungswellenlänge 450-490 nm, Sperrfilter 515 nm) durchgeführt. Um einem Ausbleichen bei der Betrachtung vorzubeugen, wurden Graufilter (N4 bzw. N16) in den Strahlengang eingelegt. Fotografische Dokumentation der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Fotoautomaten WILD MPS 46 auf Diafilm (RHP FUJICHROME 400 D Professional) durchgeführt.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen am Laserscanmikroskop

Diese Untersuchungen wurden am Laserscanmikroskop CLSM von Leica, der Universität Kassel durchgeführt².

HL-60 Zellen wurden für diese Untersuchungen standardmäßig kultiviert bzw. differenziert und für die Betrachtung die benötigte Zellzahl von ungefähr $3 \cdot 10^7$ Zellen pro Versuchsansatz abgenommen. NG- und NFB-Zellen wurden auf Deckgläschen für zwei Tage angezogen. Die Markierung mit Vesikeln geschah wie in 2.2.4 und 2.3.2 beschrieben.

² Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Zöltzer und Herrn Dr. H. F. Krug durchgeführt, denen ich an dieser Stelle dafür danken möchte.

Auf Grund von Transportproblemen markierter vitaler Zellen wurden diese mit 1 ml 2,5 % Glutaraldehyd (in Pufferlösung nach Sörensen) für 15 min fixiert und anschließend in 2 ml Pufferlösung nach Sörensen (14,35 mM K_2HPO_4 , 48,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$, pH = 7,2) aufbewahrt. Dadurch änderte sich zwar vor allem bei HL-60 Zellen die Form, die Fluoreszenzmarkierung wurde aber nicht beeinflusst. Für die Betrachtung von Vesikeln wurde der Puffer an Ort und Stelle fast völlig eingedampft, so daß zum einen die Konzentration der Vesikel in der Lösung größer war und zum anderen die Eigenbewegung dieser kleinen Objekte abnahm.

2.4.3 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Für diese Untersuchungen wurden die verschiedenen Zellen wie schon bei der Laserscanmikroskopie (s. 2.4.2) beschrieben, kultiviert. Alle Präparationsschritte bis zur Entwässerung wurden unter Eiskühlung durchgeführt. Zellsuspensionen wurden zunächst bei 100 g in der *Digifuge* abzentrifugiert, Vesikel bei 30000 g in der Ultrazentrifuge L3-50 mit dem Rotor SW41 (BECKMAN, München). Sowohl die auf Membraneinsätzen kultivierten Zellen als auch die abzentrifugierten Proben wurden zunächst für eine Stunde mit 1 %igem Glutaraldehyd (in Cacodylatpuffer mit 0,05 M Cacodylsäure (SERVA, Heidelberg) und 0,05 M Saccharose, mit HCl auf pH=7 eingestellt) fixiert. Anschließend wurden Zellen bzw. Vesikel dreimal mit 0,1 M Cacodylatpuffer (0,1 M Cacodylsäure und 0,1 M Saccharose, mit 1 M HCl auf pH=7,0 eingestellt) gewaschen. An dieser Stelle wurden die Membranen in Stücke von 2 mm x 10 mm geschnitten. Alle Proben wurden zur Nachfixierung für zwei Stunden in 1%ige OsO_4 -Lösung (SERVA, Heidelberg) in Veronal-Puffer (0,14 M Natriumdiethylbarbitursäure mit 0,14 M Natriumacetat $\cdot 3 H_2O$) überführt, danach dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und für eine Stunde in Uranylacetatlösung (2 % in H_2O ; SERVA, Heidelberg) belassen.

Bei der Suspensionskultur sowie den Vesikeln mußten an dieser Stelle weitere Verarbeitungsschritte eingefügt werden: Die Proben wurden bei 30000 g bzw. 100 g abzentrifugiert und in 3 %igem Agar (in Wasser) aufgenommen. Nach dem Erkalten bei 4 °C wurde die Proben-Agar-Masse in kleine Blöckchen geschnitten. Alle weiteren Schritte waren wieder mit denen auf Membranen kultivierten Zellen identisch. Nach Entwässerung in der alkoholischen Reihe verblieben die Proben für 20 Minuten in einer Epon-Ethanollösung 1:1 (5 ml Epon 812, 11 ml Araldithärter, 3 ml Araldit, jeweils SERVA, Heidelberg). Anschließend wurden die Proben in Epon zweimal 18 Stunden bei Raumtemperatur und einmal für eine Stunde bei 60 °C im Wärmeschrank, jeweils zum Entgasen in einem unter Unterdruck stehenden Exsikkator, aufbewahrt. Das Aushärten der Proben nach dem Einbetten erfolgte während drei bis fünf Tagen im Wärmeschrank bei 60 °C.

Die Proben wurden mit dem Ultramikrotom (DuPONT-INSTRUMENTS, Bad Nauheim; Sorvall MT2-B Ultra Microtome) in Schnittdicken von 90 bis 140 nm geschnitten, mit 2 %iger Uranylacetatlösung 0,5 bis 1 Minute lang und mit alkalischer Bleicitratlösung (80 mM Bleinitrat, 12 mM Natriumcitrat $\cdot 2 H_2O$, 8 ml 1 M NaOH in 50 ml Wasser) 3 bis 5 Minuten lang doppelkontrastiert und mit dem Transmissionselektronenmikroskop Elmiskop 1A (SIEMENS, Mannheim) untersucht.

2.4.4 Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop

Diese wohl häufigste Art der Oberflächenuntersuchung von Zellen bietet den Vorteil der wesentlich besseren Vergrößerung, wobei diese Untersuchungsart nur mit fixierten, also nicht mehr vitalen Zellen möglich ist. Diese Untersuchungen sind ausschließlich auf Oberflächenuntersuchungen.

Zur Aufbereitung der Probe wurden die auf Membraneinsätzen kultivierten Zellen mit PBS gewaschen, jeweils 30 Minuten in Puffer A, B und C (s.u.) inkubiert und zweimal 5 min lang mit Wasser gewaschen. Nach Durchlaufen der Alkoholreihe (jeweils 5 min 35 %, 70 %, 85 %, 95 %, 100 % Ethanol) wurden die Membranen für 5 min mit Hexamethyldisilazan (SIGMA, München) behandelt und bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die weitere Aufarbeitung der Proben sowie die mikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Herrn Schüler, IMT, Kernforschungszentrum Karlsruhe durchgeführt.

Verwendete Puffer:

Cacodylatpuffer:		0,2 M Cacodylsäure, mit 1 M HCl auf pH=7 eingestellt
Puffer A:	10 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
	4 ml	filtrierter Glutaraldehyd
	6 ml	Wasser
Puffer B:	10 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
	1,4 g	Saccharose
	10 ml	Wasser
Puffer C:	7,5 ml	0,2 M Cacodylatpuffer
	7,5 ml	OsO ₄

2.5 Darstellung der Ergebnisse

Unabhängig von der Art der Markierung wurden die Zellen zunächst mit den verschiedenen markierten Substanzen im Kühlschrank bzw. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in den entsprechenden Gefäßen zur eigentlichen Inkubation in den Brutschrank gestellt. Als Zeitpunkt 0 ist in den Darstellungen der Zeitpunkt definiert, ab dem die Zellen im Brutschrank inkubiert wurden. Dementsprechend kennzeichnet der Zeitpunkt -1 den Zeitpunkt des Beginns der Vesikelinkubation mit den Zellen.

A) Darstellung von Versuchen mit radioaktiven Substanzen

Bei Betrachtung der einzelnen Lipide in den Zellen und Überständen wurde die Summe aller durch Lipidextraktion extrahierbaren Aktivitäten gleich 100 % gesetzt. Die Angaben sind dementsprechend in Prozent der Aktivität.

Wurde hingegen das Verhältnis der Aktivitäten der Zellen, Überstände bzw. wässrigen Phasen nach Lipidextraktion betrachtet, so wurde deren Summe auf 100 % gesetzt und die jeweiligen Anteile berechnet.

B) Darstellung von Versuchen mit fluoreszierenden Substanzen

Die mit Hilfe des Fluoreszenzphotometers gemessenen Emissionsraten konnten direkt in Prozent der jeweils höchsten Fluoreszenzintensität (Fluoreszenz [%]) angegeben werden.

Die meisten berechneten Ergebnisse beziehen sich auf Daten, die mit Hilfe der HPLC gewonnen wurden. Die einzelnen Flächen wurden durch Integration der Peaks, die sich auf Grund ihrer Retentionszeiten bestimmten Substanzen zuordnen ließen, berechnet. Dies ließ sich durch die Software der Firma WATERS, Eschborn sehr einfach bewerkstelligen. Bei den erhaltenen Werten handelte es sich um relative Flächeneinheiten, die die Fluoreszenzintensitäten widerspiegeln. Diese sind wiederum proportional der einzelnen Substanzmengen, sofern, wie hier geschehen, durch Wahl des richtigen Meßbereichs, Selbstquencheffekte der Substanzen ausgeschaltet werden. Mit Hilfe von Standardsubstanzen ließen sich den Flächen Substanzmengen (Angaben in Mol) zuordnen. Diese Absolutwerte gingen in die Darstellungen, jeweils bezogen auf eine eingesetzte Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ bei HL-60 Zellen bzw. $3 \cdot 10^5$ bei NG- und NFB-Zellen, ein.

Waren keine Standardsubstanzen vorhanden oder sollte die Gesamtfluoreszenz in den Zellen mit der im Überstand vorhandenen verglichen werden, so wurden die einzelnen Peakflächen einander gegenübergestellt, indem die Summe der Peakflächen auf 100 % gesetzt und der prozentuale Anteil der einzelnen Peakflächen ermittelt wurde. Diese Werte wurden als prozentualer Anteil der Fluoreszenz (Fluoreszenz [% Peakfläche]) angegeben. Angaben, die die Abnahme der Fluoreszenzmarkierung über die Zeit mit einbeziehen, wurden hierbei nicht berücksichtigt.

2.6 Statistische Auswertung

Waren drei und mehr Werte vorhanden, wurden jeweils Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Statistische Unterschiede zwischen den Ergebnissen wurden mit Hilfe des Student-t-Tests ermittelt. Als "signifikant" wurden Ergebnisse dann bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist.

3 Ergebnisse

In diesem Teil werden, wie schon im Teil "Material und Methoden", aus Übersichtlichkeitsgründen vorwiegend die in der Liste angegebenen Abkürzungen verwendet.

3.1 Untersuchungen zu den verwendeten fluoreszierenden Lipiden

3.1.1 Auswahl geeigneter fluoreszierender Fettsäuren durch Einbauuntersuchungen in zelluläre Lipide

Zur Auswahl einer nicht reacylierbaren fluoreszierenden Fettsäure waren HL-60 Zellen mit C₆-NBD-FS, C₁₁-NBD-FS, 4-Pyren-FS, 10-Pyren-FS oder PHTB-FS inkubiert worden. Die Lipidextrakte wurden nach 3 bzw. 24 Stunden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Bei der Darstellung in Abb. 8 zeigt sich, daß alle längerkettigen Lipidvarianten (C₁₁-NBD-FS, 10-Pyren-FS und PHTB-FS) unabhängig von ihrer Polarität ein- und umgebaut werden können. Dies spiegelt sich wider durch das Erscheinen von nicht näher bestimmten fluoreszierenden Flecken nach Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie. Mit C₆-NBD-FS läßt sich hingegen kein Umbau feststellen. Betrachtet man die 4-Pyren-FS, so zeigen sich ebenfalls überwiegend keine weiteren fluoreszierenden Lipide. Allerdings existieren auch in seltenen Fällen Gegenbeispiele.

Um den möglichen Einbau von C₆-NBD-FS noch präziser nachweisen zu können, wurde der Lipidextrakt von HL-60, NG-, sowie NFB-Zellen, die mit dieser Fettsäure inkubiert waren, mit Hilfe der HPLC aufgetrennt. Auch mit dieser genauen Bestimmung läßt sich nach 24 Stunden Inkubation in allen Fällen lediglich unverändert C₆-NBD-FS finden (ohne Abbildung). Damit kann man davon ausgehen, daß diese fluoreszierende Fettsäure durch die Enzyme der verwendeten Zellen nicht reacyliert werden kann.

Abb. 8 Fotografische Darstellung einer Dünnschichtplatte unter UV-Licht. Auf dieser Dünnschichtplatte sind die nach Inkubation von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Fettsäuren extrahierten Lipide aufgetrennt.

3ho = Inkubation während 3 Stunden in Inkubationsmedium (ohne FKS)

3hm = Inkubation während 3 Stunden in Inkubationsmedium mit Zusatz von 3,3 % FKS

24hm = Inkubation während 24 Stunden in Inkubationsmedium mit Zusatz von 3,3 % FKS

FS = Standard der jeweils verwendeten Fettsäure

Das Ergebnis wurde 4mal verifiziert.

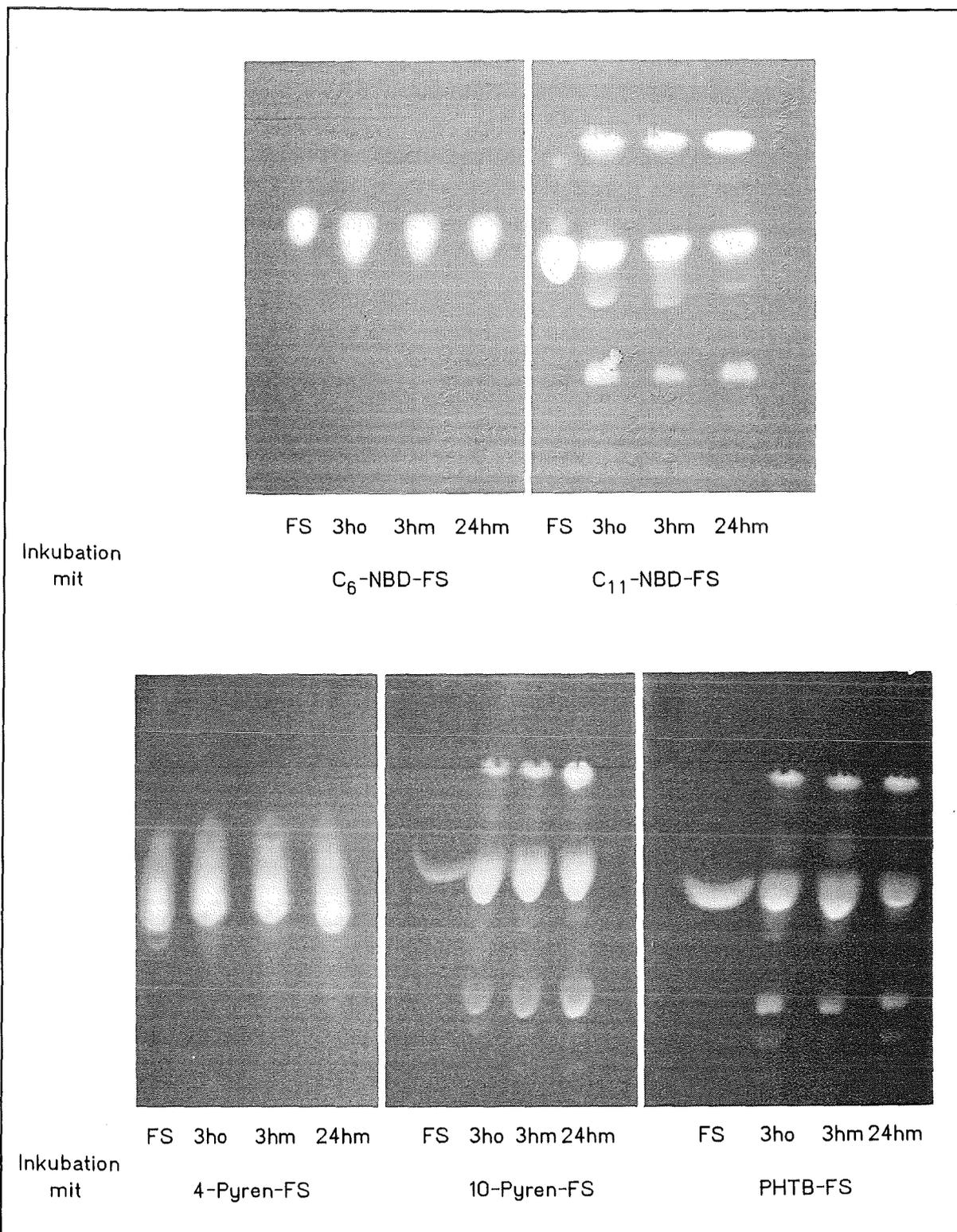


Abb. 8

3.1.2 Verifizierung der hergestellten C_6 -NBD-markierten Lipide

Zur Überprüfung der hergestellten fluoreszierenden Lipide wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet:

Dünnschichtchromatographische Trennungen ergeben hierzu deutliche Hinweise. Nach Herstellung und Auftrennung der hergestellten Lipide C_6 -NBD-PA, C_6 -NBD-DG, C_6 -NBD-PE, C_6 -NBD-PS sowie des käuflich erwerbbar Lipids C_6 -NBD-PC und C_6 -NBD-FS ergibt die Dünnschichtplatte unter UV-Licht folgendes Bild (Abb. 9):

Abb. 9 Fotografie einer Dünnschichtplatte unter UV-Licht, auf der alle verwendeten, mit dem Fluorophor C_6 -NBD markierten Lipide aufgetrennt sind.

Alle hergestellten Lipide weisen durch ihre unterschiedliche Lokalisation einen voneinander abweichenden R_f -Wert auf. Die Lage der Banden der Substanzen C_6 -NBD-PA, C_6 -NBD-DG und C_6 -NBD-PS, sowie der Referenzsubstanzen C_6 -NBD-PC und C_6 -NBD-FS stimmt zudem mit Literaturwerten überein (Pagano und Longmuir, 1983).

Zusätzlich ergibt die Auftrennung mittels HPLC ebenfalls die Bestätigung, daß es sich bei den unterschiedlichen R_f -Werten nicht um eine Verschiebung durch andere, gleichzeitig extrahierte Substanzen handelt, da auch hier alle hergestellten fluoreszierenden Substanzen voneinander getrennt werden können und eine reproduzierbare Retentionszeit besitzen. (s. Abb. 7, Seite 19, Material und Methoden).

Durch die Methode der NMR-Spektroskopie lassen sich bei reinen Substanzen Rückschlüsse auf den Molekülaufbau ziehen, was vor allem bei den selbst hergestellten C_6 -NBD-markierten Lipiden wichtig ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Spektren nicht abgebildet.

Durch die Protonenkernspinresonanzspektroskopie können bei den Substanzen C_6 -NBD-PC, C_6 -NBD-DG, C_6 -NBD-PA und C_6 -NBD-PS das Glycerin, die beiden Fettsäureketten (wobei deren Länge nicht genau bestimmbar ist) und die Protonen des NBD-Ringes identifiziert werden. Die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen ergeben sich durch elektronenziehende Gruppen am NBD-Ring (Cl oder NO_2). Bezüglich der Struktur der Kopfgruppen gibt es keine Hinweise, da die chemischen Verschiebungen der Kopfgruppenprotonen mit den chemischen Verschiebungen von nicht weiter definierten Verunreinigungen zusammenfallen. Diese Verunreinigungen sind allerdings bereits bei der käuflich erworbenen Ausgangssubstanz C_6 -NBD-PC vorhanden. Eine Reinigung der Lipide bis zur spektroskopischen Reinheit ist aufgrund der geringen Mengen schwierig.

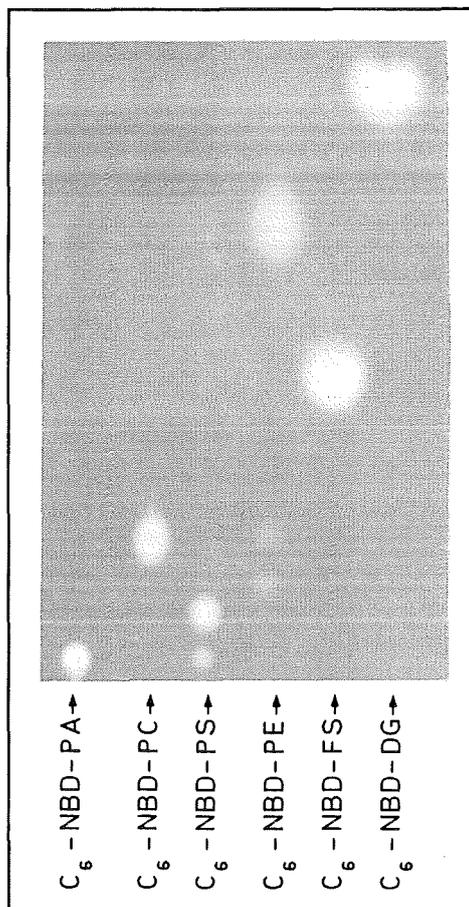


Abb. 9

Durch Phosphorkernspinresonanzspektroskopie lassen sich die phosphorhaltigen Lipide C₆-NBD-PA und C₆-NBD-PC vom nicht phosphorhaltigen C₆-NBD-DG unterscheiden.

3.1.3 Untersuchung der Eigenschaften der fluoreszierenden Lipide

3.1.3.1 Fluoreszenzspektren

Um eine mögliche Differenzierung durch Fluoreszenzspektren zu untersuchen, wurden Emissions- wie auch Exzitationsspektren erstellt. Diese sind in Abb. 10 dargestellt. Wie sich zeigt, lassen sich die mit dem Fluorophor NBD markierten Substanzen nicht unterscheiden. Alle Substanzen haben eine Extinktionswellenlänge von ungefähr 470 nm und eine Emissionswellenlänge von ungefähr 525 nm.

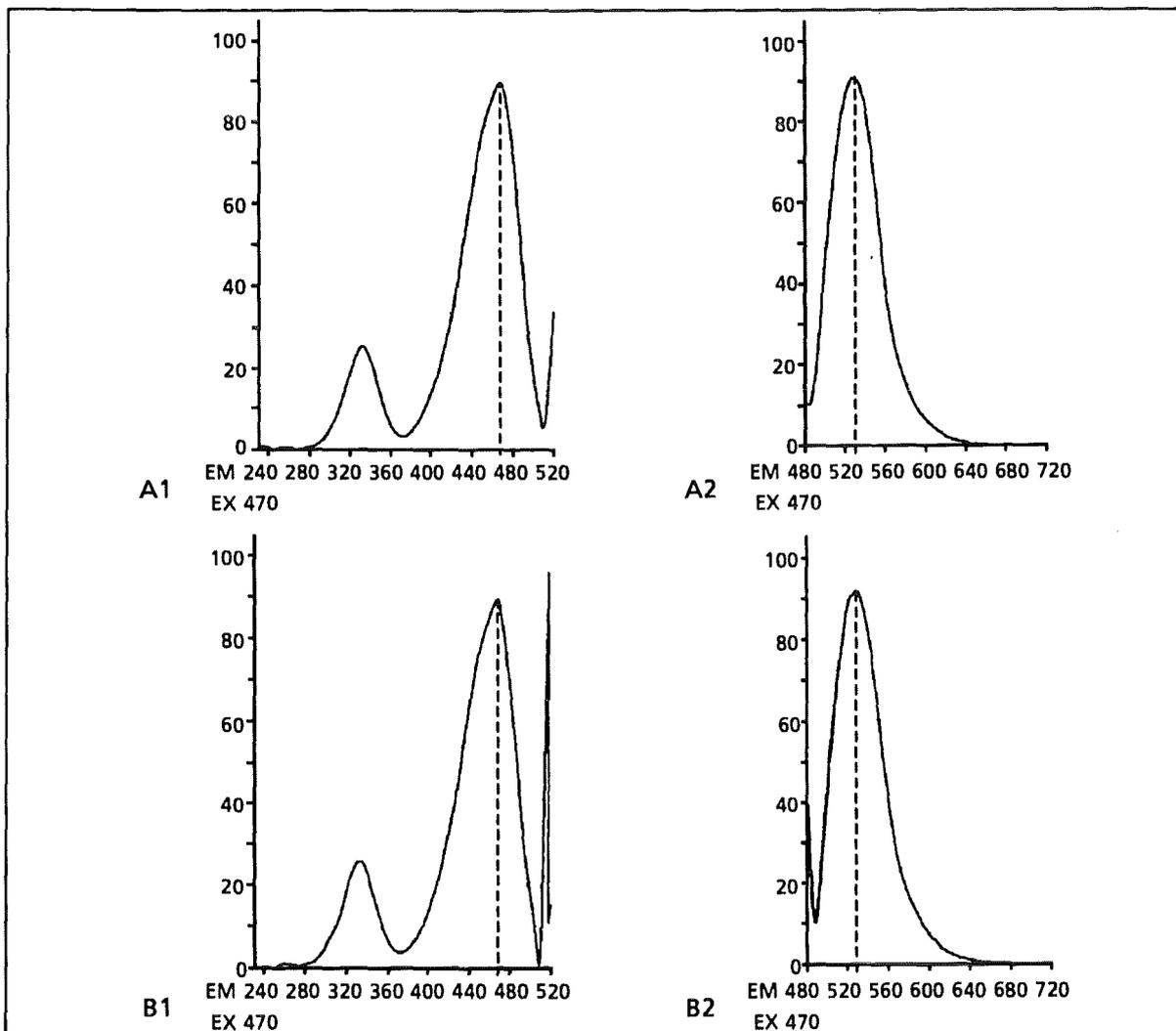


Abb. 10 (1. Teil) Exzitations- und Emissionsspektren der verwendeten, mit dem Fluorophor C₆-NBD markierten Lipide.

A: C₆-NBD-PC

B: C₆-NBD-PA

1: Exzitationsspektrum

2: Emissionsspektrum

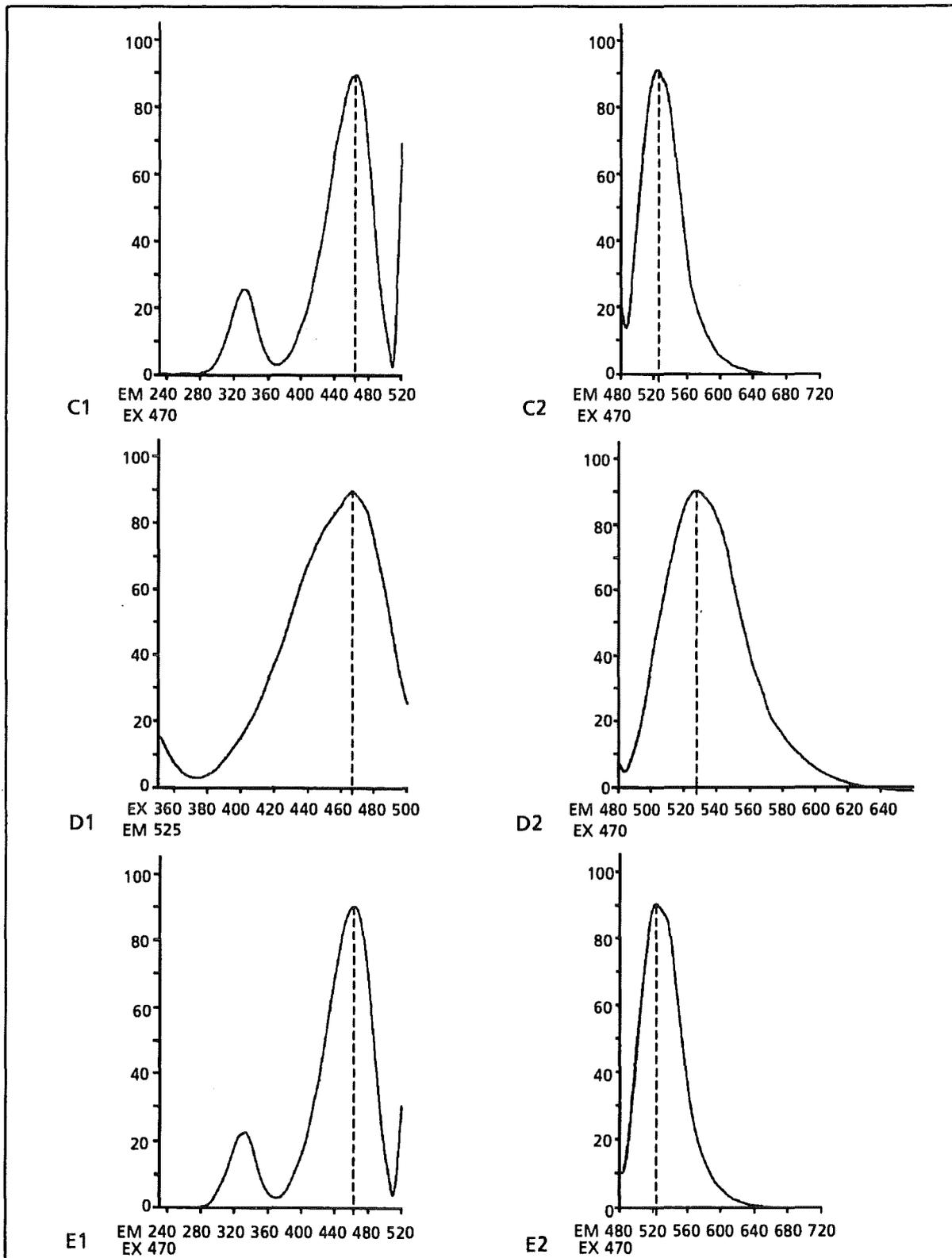


Abb. 10 (2. Teil) Exzitations- und Emissionsspektren der verwendeten, mit dem Fluorophor C_6 -NBD markierten Lipide.

C: C_6 -NBD-DG

D: C_6 -NBD-PS

E: C_6 -NBD-PE

1: Exzitationsspektrum

2: Emissionsspektrum

3.1.3.2 Bestimmung der Fluoreszenzintensität von C₆-NBD-PC und C₆-NBD-FS in Abhängigkeit von Substanz und Lösungsmittel

Vergleicht man die beiden Kalibrierungen von C₆-NBD-PC und C₆-NBD-FS (Abb. 11), so fällt die um den Faktor 1,4 bis 1,8 höhere Fluoreszenzintensität von C₆-NBD-FS auf. Da die Messung mit Hilfe der HPLC durchgeführt wurde und die Fluoreszenzintensität der Lipide in wasserhaltigem Methanol geringer ist als in reinem Methanol, (s.u.: Fluoreszenzintensitäten in verschiedenem Lösungsmittel, Abb. 12) wäre dieser Faktor insofern noch höher, wenn die Laufmittelzusammensetzung bei beiden Substanzen Methanol wäre. C₆-NBD-FS wurde aber bei einer Laufmittelzusammensetzung von ungefähr 75 % Methanol : 25 % Wasser, C₆-NBD-PC hingegen bei nahezu 100 % Methanol eluiert und gemessen.

Wie ebenfalls aus den Kalibrierungen ersichtlich, läßt sich bei dieser Methode je nach Empfindlichkeitseinstellung des Fluoreszenzdetektors die C₆-NBD-FS mit ihrem scharfen Peak bis in den pg-Bereich bestimmen.

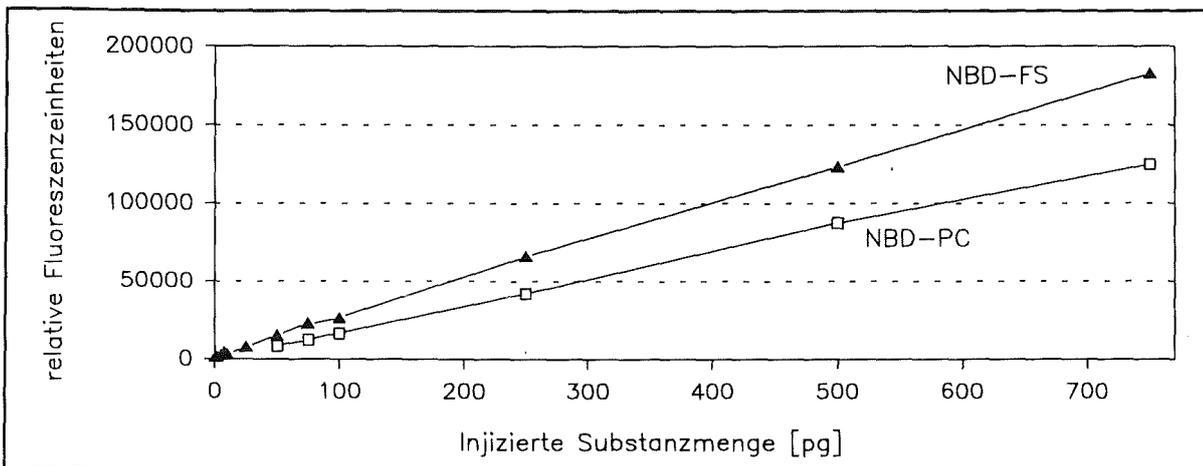


Abb. 11 Kalibrierung von C₆-NBD-FS und C₆-NBD-PC

Die Bestimmungen wurden mit Hilfe der HPLC bei der Empfindlichkeitseinstellung des Detektors mit Dämpfung 2 (*Attenuation* 2), Faktor 1000x vorgenommen.

Betrachtet man die Fluoreszenzintensitäten bei Lösung der Substanzen in verschiedenen Lösungsmitteln, so zeigen sich bei den beiden hier dargestellten NBD-markierten Substanzen ähnliche Verhältnisse (Abb. 12). Die höchste Intensität liegt bei Lösung in Chloroform vor. Bei den auch zur Auftrennung mittels HPLC verwendeten Laufmittelgemische bestehend aus Methanol und Wasser läßt sich in beiden Fällen eine starke Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Wasseranteil feststellen.

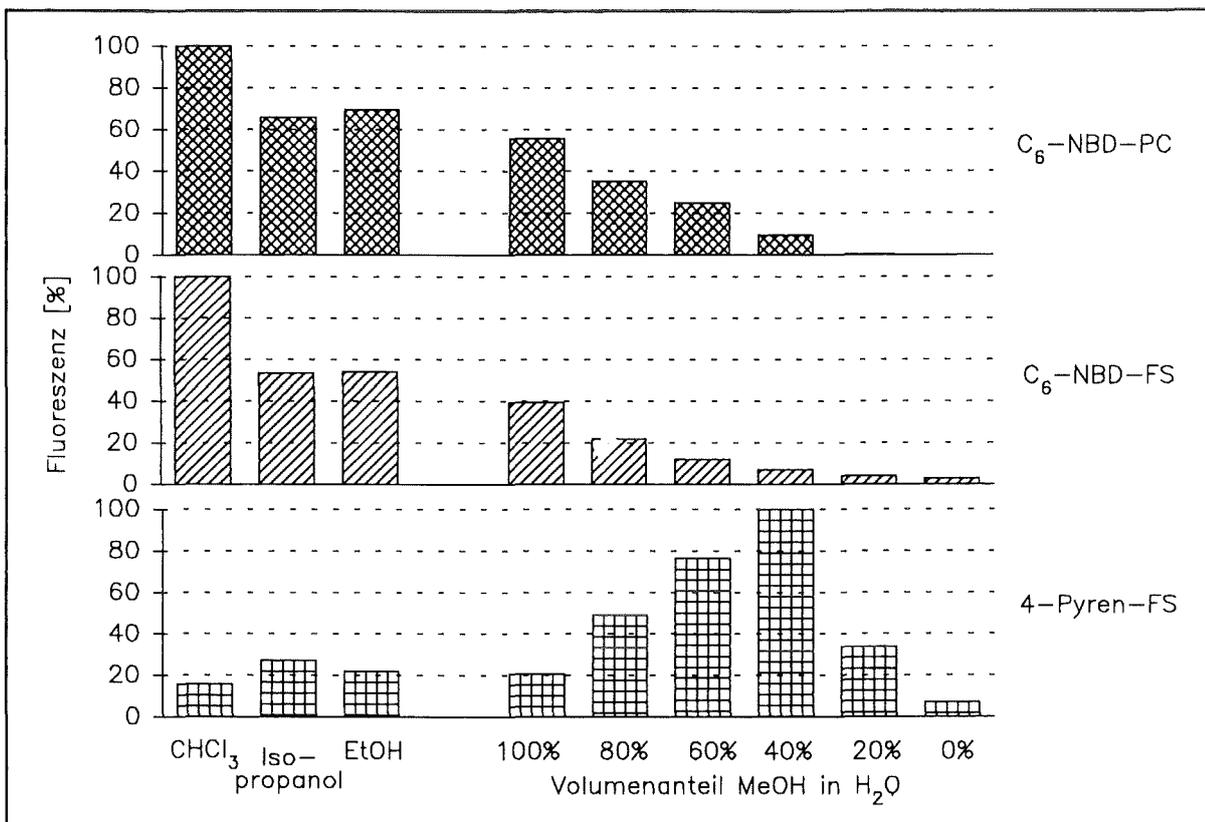


Abb. 12 Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von C₆-NBD-PC, C₆-NBD-FS und 4-Pyren-FS in verschiedenen Lösungsmitteln.

Die jeweils höchste Fluoreszenzintensität ist hier auf 100 % gesetzt.

Je nach Art des fluoreszierenden Anteils der künstlichen Lipide ist bei anderen Substanzen, wie z.B. der hier in der Abbildung ebenfalls dargestellten 4-Pyren-FS, die Fluoreszenzintensität in den unterschiedlichen Lösungsmitteln verschieden.

3.1.3.3 Stabilitätsuntersuchungen der Lipide in verschiedenen Inkubationsmedien

Als Voruntersuchung zur Auswahl geeigneter Inkubationsmedien zur Zellinkubation wurden verschiedene Medien daraufhin getestet, inwieweit sie die Ausgangslipide verändern können.

Wie Abb. 13 zeigt, wird aus C₆-NBD-PC durch Standardmedium bereits ohne Einwirkung von Zellen die freie fluoreszierende Fettsäure abgespalten. Die synthetisch hergestellten Ersatzstoffe für FKS, Ultroser G und CPSR-1, haben ähnliche Auswirkungen.

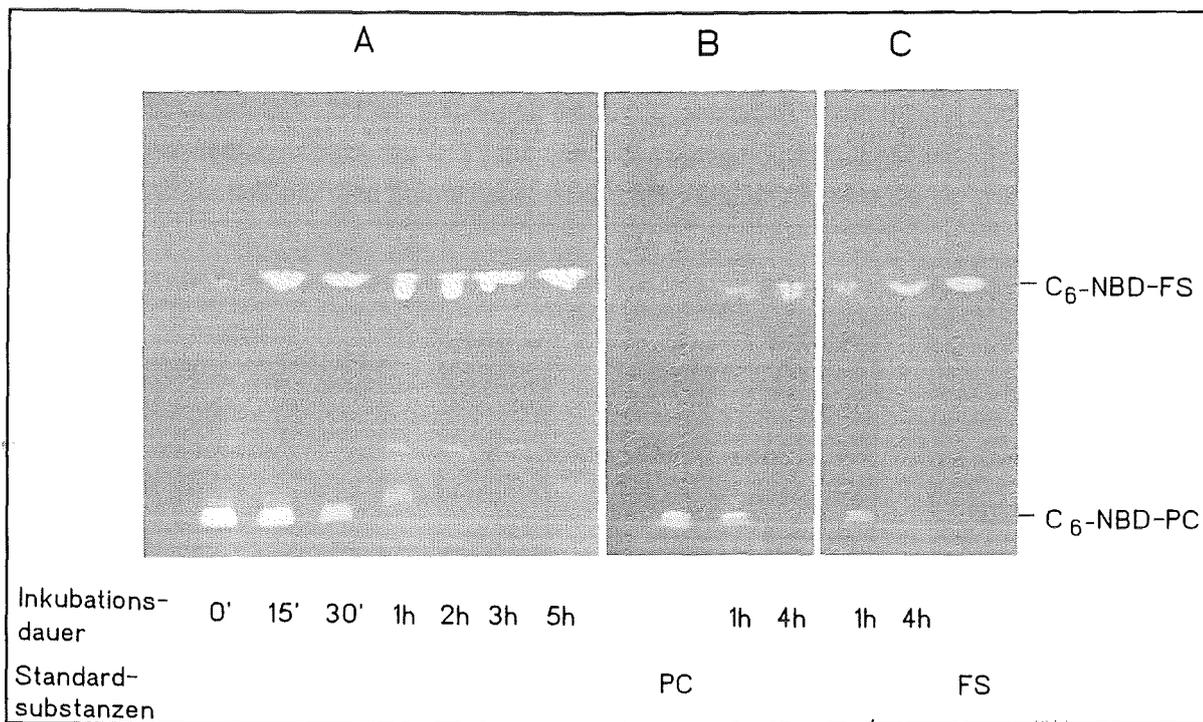


Abb. 13 Fotografische Darstellung von Dünnschichtplatten unter UV-Licht, die den Abbau des $C_6\text{-NBD-PC}$ nach Inkubation in Standardmedium (A), Standardmedium ohne FKS mit Ultrosor G (B) und Standardmedium ohne FKS mit CPSR-1 (C) demonstrieren.

Im Standardmedium ist der darin enthaltene Bestandteil FKS für die Fettsäureabspaltung verantwortlich (Abb. 14). Das FKS muß eine Substanz bzw. einen Faktor enthalten, der z.B. durch Autoklavieren zerstört werden kann und damit das $C_6\text{-NBD-PC}$ nicht mehr abbaut. Allerdings ist die Vitalität von HL-60 Zellen in diesem Medium um die Hälfte verringert.

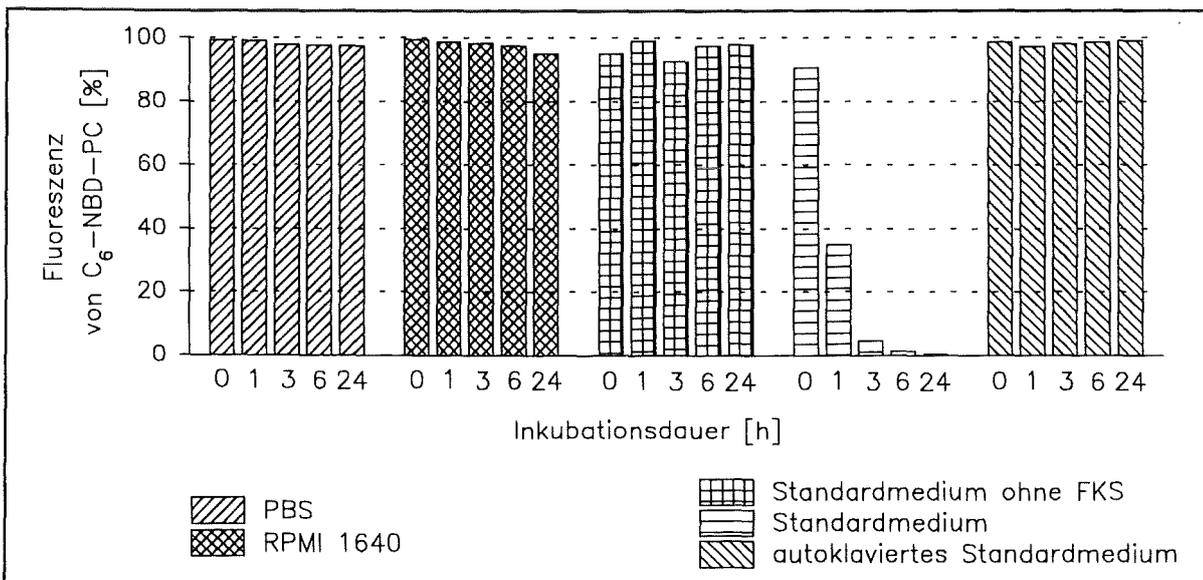


Abb. 14 Einfluß von Medien bzw. Medienbestandteilen auf den Abbau von $C_6\text{-NBD-PC}$ zu $C_6\text{-NBD-FS}$. Darstellung des Anteils der Fluoreszenz von $C_6\text{-NBD-PC}$.

Inkubationsmedium, also Medium, welches kein FKS enthält, dem dafür aber Insulin, Transferrin und Selen zur Erhöhung der Vitalität der Zellen zugesetzt ist, zeigt kaum Abbaufähigkeit des C_6 -NBD-PC über 31 Stunden (Abb. 15). In dieser Abbildung ist zudem dargestellt, daß die Fluoreszenzintensität trotz Inkubation im Dunkeln (Brutschrank) nach 31 Stunden auf 77 % der Ausgangsintensität zurückgeht, was sich lediglich mit einer Zerstörung der Fluoreszenzmarkierung über die Zeit erklären läßt.

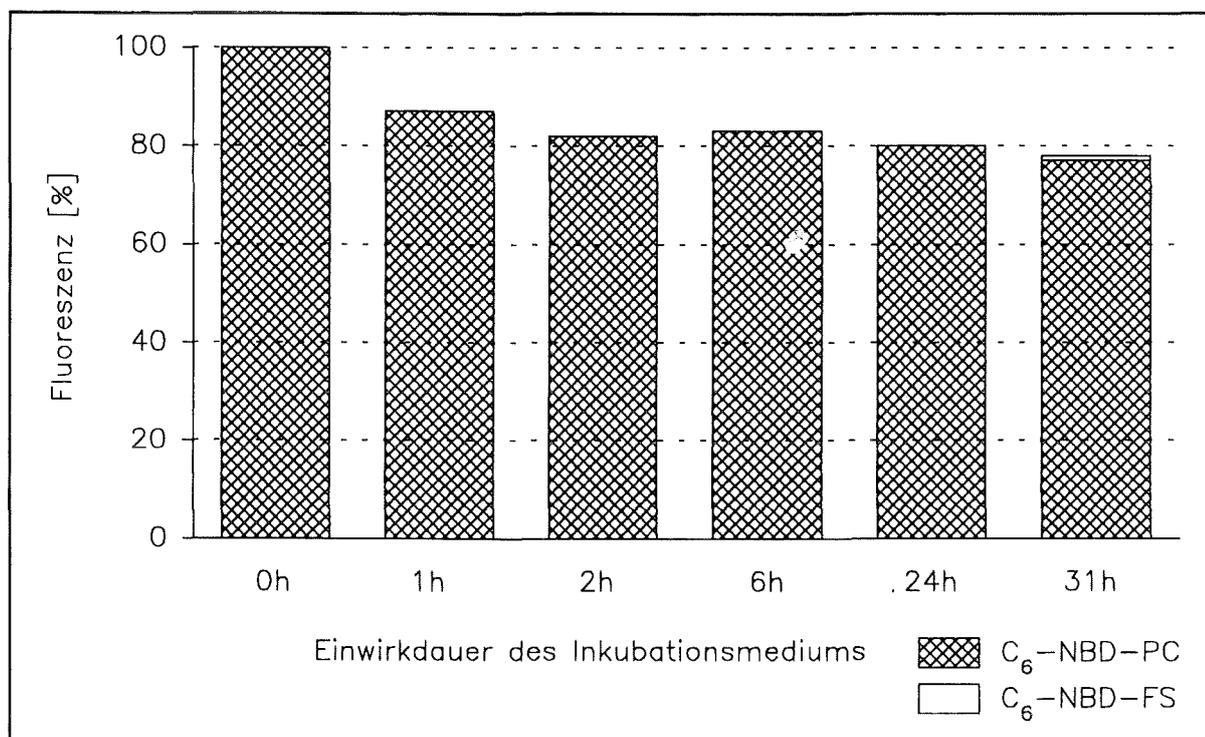


Abb. 15 Turnover von C_6 -NBD-PC unter Berücksichtigung der Abnahme der Fluoreszenzmarkierung ohne zellulären Einfluß. Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 = 100 %.

Radioaktiv markierte Lipide sind gegenüber FKS und damit auch gegenüber Standardmedium stabiler als NBD-markierte. ^{14}C -Pal-PC wird über 48 Stunden in vernachlässigbar geringen Mengen abgebaut. ^{14}C -Ara-PC wird über die gleiche Zeit zu 4,1 % in Ara und zu 3,6 % in Eicosanoide umgebaut, während aus ^{14}C -Ara-PE nach 2 Tagen bereits fast 11 % Ara und nach 7 Tagen über 18 % Ara freigesetzt sind (Abb. 16).

3.1.3.4 Stabilitätsuntersuchungen von markierten Lipiden in verschiedenen zellulären Systemen

Untersucht man, inwieweit C_6 -NBD-PC in verschiedenen zellulären Systemen abgebaut wird, so zeigt sich, daß zum einen die Fluoreszenzmarkierung durch die Inkubation mit Zellen vermehrt zerstört wird (vergleiche Abb. 17 mit Abb. 15). Zum anderen wird auch das C_6 -NBD-PC vermehrt zu C_6 -NBD-FS abgebaut. Die Höhe dieses Abbaus hängt dabei von der Zellart ab. HL-60 Zellen bauen am schnellsten ab (man beachte die Zeitachse), NFB-Zellen bei Vergleich der Zellen am wenigsten. Bei diesen Zellen liegt nach 48 Stunden noch 56 % fluoreszenzmarkierte Substanz gegenüber der Ausgangsfluoreszenz vor, 43 % davon als C_6 -NBD-PC, die restlichen 57 % als C_6 -NBD-FS. Bei NG-Zellen sind dies nach 48 Stunden 49 % fluoreszenzmarkierte Substanz gegenüber der Ausgangsfluoreszenz, davon 18 % als C_6 -NBD-PC.

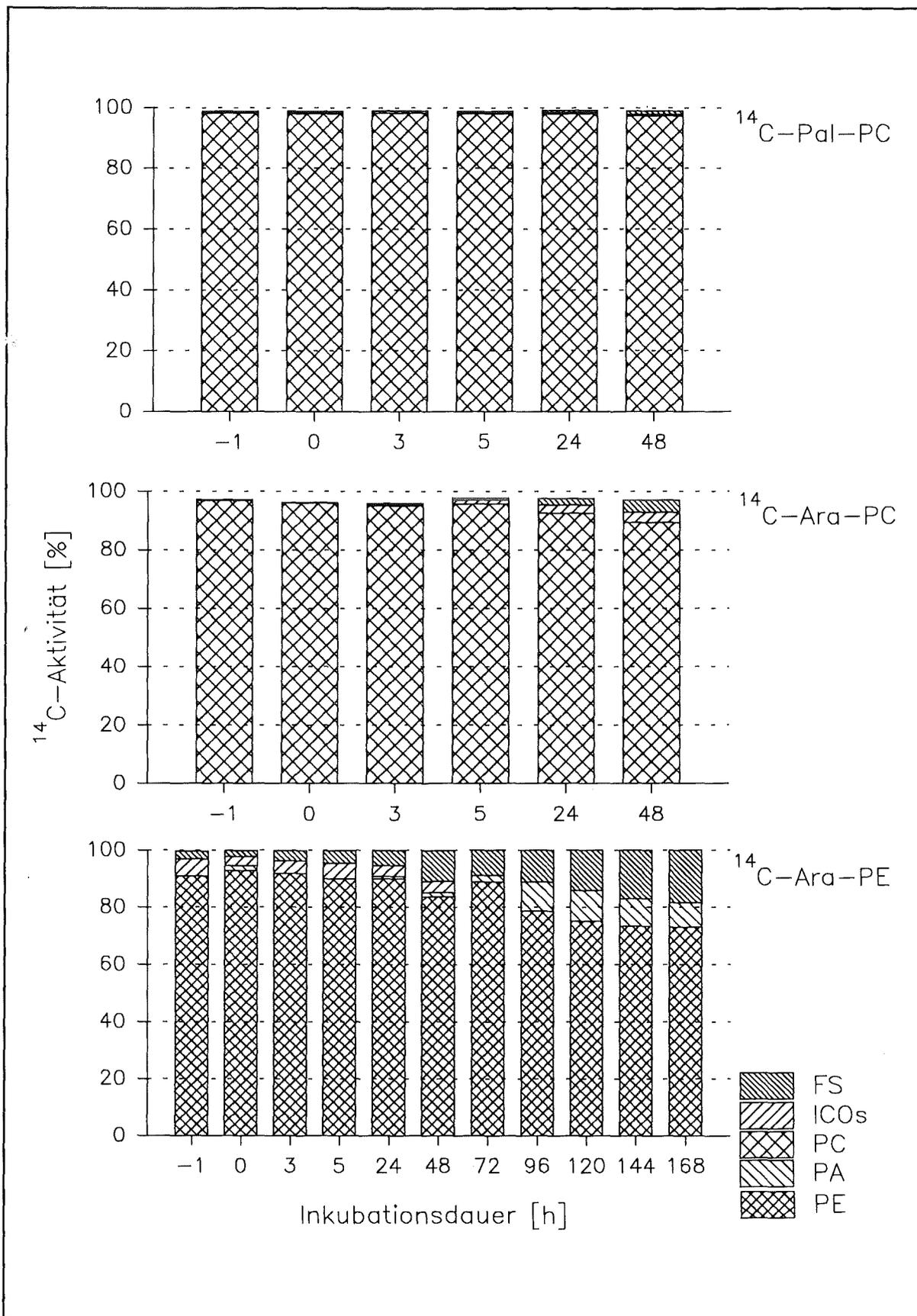


Abb. 16 Turnover von radioaktiv markierten Lipiden in Standardmedium. Gesamte durch Lipidextraktion extrahierte ^{14}C -Aktivität = 100 %.

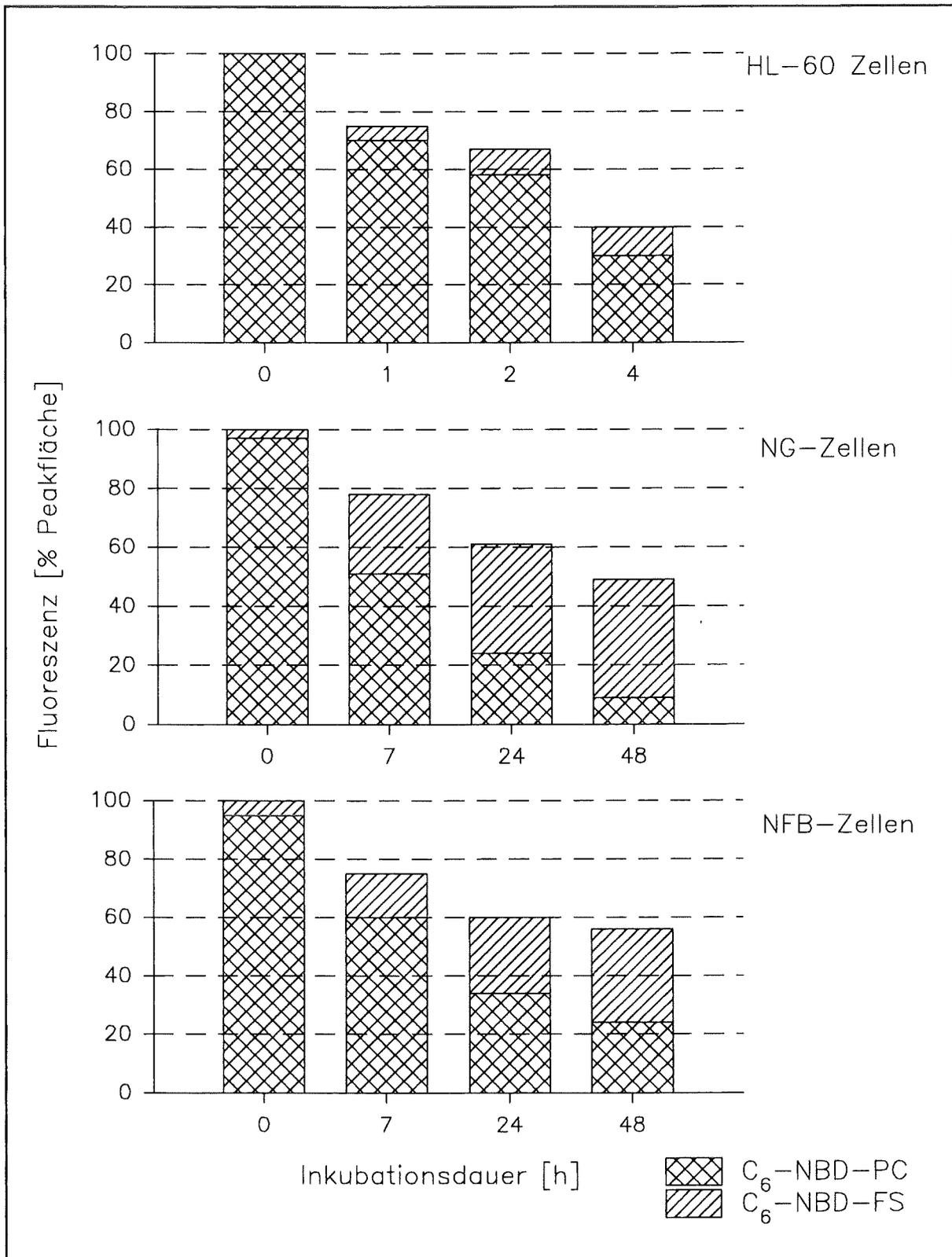


Abb. 17 Turnover von C_6 -NBD-PC und Abnahme der Fluoreszenzmarkierung unter zellulärem Einfluß. Ausgangsfluoreszenz = 100 %. Darstellung des Einflusses von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen, sowie NG- und NFB-Zellen.

Die radioaktive Markierung ist naturgemäß durch die langen Halbwertszeiten wesentlich stabiler als die Fluoreszenzmarkierung, unterliegt somit auch keinem zeitlich bedingten Markierungsverlust. Reine Stabilitätsuntersuchungen sind insofern unter zellulärem Einfluß nicht möglich, da freigesetzte Fettsäuren von den Zellen in jedem Fall in gewissen Umfang aufgenommen und eingebaut werden können und das Ergebnis somit von einem Turnover innerhalb der Zellen nicht unterscheidbar ist.

3.1.4 Abbaubarkeit von C_6 -NBD-PC durch externe PLA_2

Werden C_6 -NBD-PC-Vesikel mit PLA_2 aus Schweinepankreas versetzt, so ist ein zeitlich abhängiger Abbau zu beobachten. Nach 2 Stunden Inkubation ist nahezu die gesamte fluoreszierende Fettsäure freigesetzt (Abb. 18).

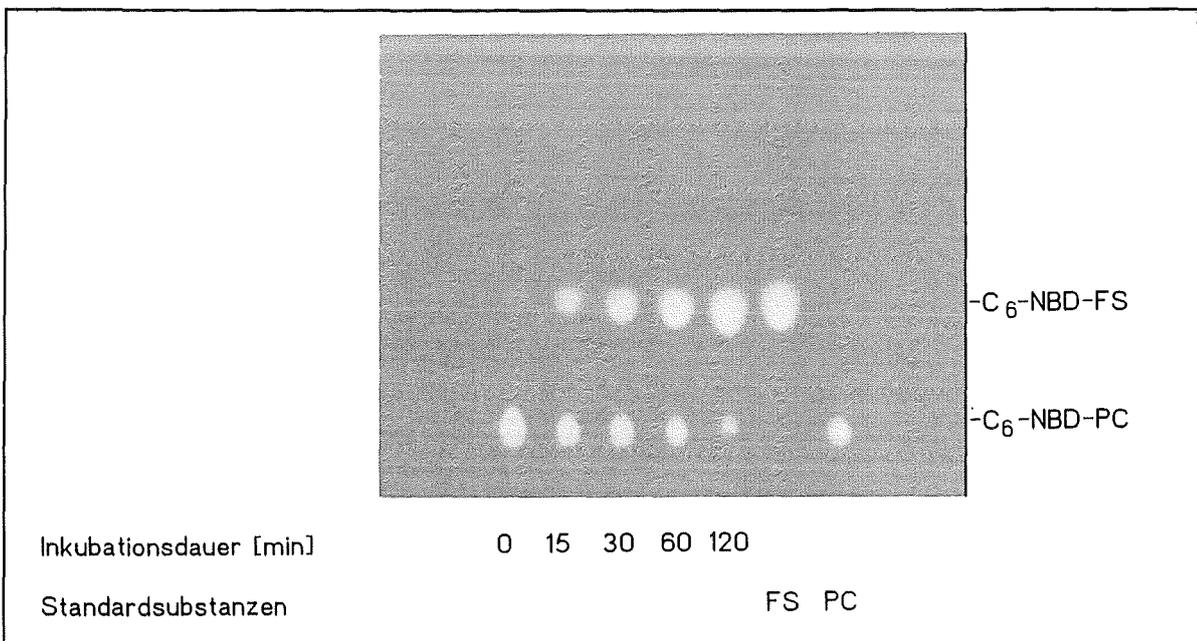


Abb. 18 Fotografie einer Dünnschichtplatte unter UV-Licht, die die Auftrennung NBD-markierter Lipide bei verschieden langer Inkubationsdauer von C_6 -NBD-PC mit PLA_2 aus Schweinepankreas zeigt.

3.1.5 Mikroskopische Untersuchungen zur Beschaffenheit der Vesikel

Durch Ultraschall oder Eintrag in wässriges Medium hergestellte Vesikel ergeben unter dem Fluoreszenzmikroskop nur eine diffuse Färbung. Strukturen sind nicht erkennbar.

Bessere Bilder ergeben sich hingegen, wenn die Vesikel mit Hilfe des Laserscanmikroskops untersucht werden. Bei Vesikeln, die aus C_6 -NBD-PE bestehen, bilden die Membranen ringförmige Strukturen (Abb. 19 a). C_6 -NBD-PC, mit und ohne Lecithin als Vesikel hergestellt, sowie C_6 -NBD-PA, C_6 -NBD-PS und C_6 -NBD-DG ergeben mehr lamellenartige Strukturen (Abb. 19 b). Trotzdem sollen diese Strukturen im weiteren als Vesikel und nicht Lamellen bezeichnet werden.

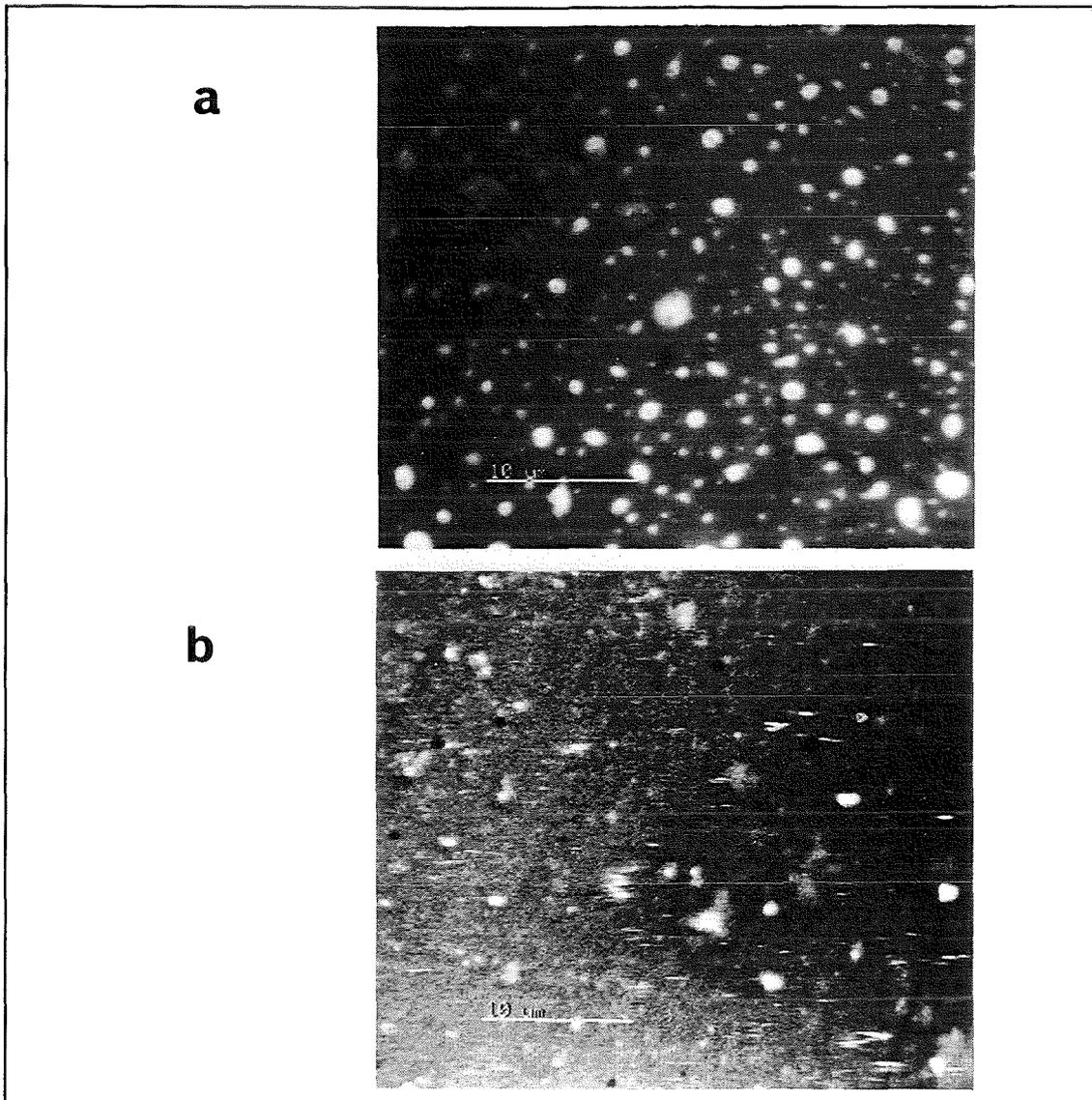


Abb. 19 Laserscanmikroskopische Aufnahmen von Vesikeln; Maßstab im Bild

a) Vesikel aus C_6 -NBD-PE

b) Vesikel aus C_6 -NBD-PC

Diese meist lamellenartigen Strukturen finden sich auch bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen, wobei beide Teile der Membrandoppelschicht an einigen Stellen sehr gut zu erkennen sind. Exemplarisch sind in Abb. 20 Vesikel aus C_6 -NBD-PC gezeigt.

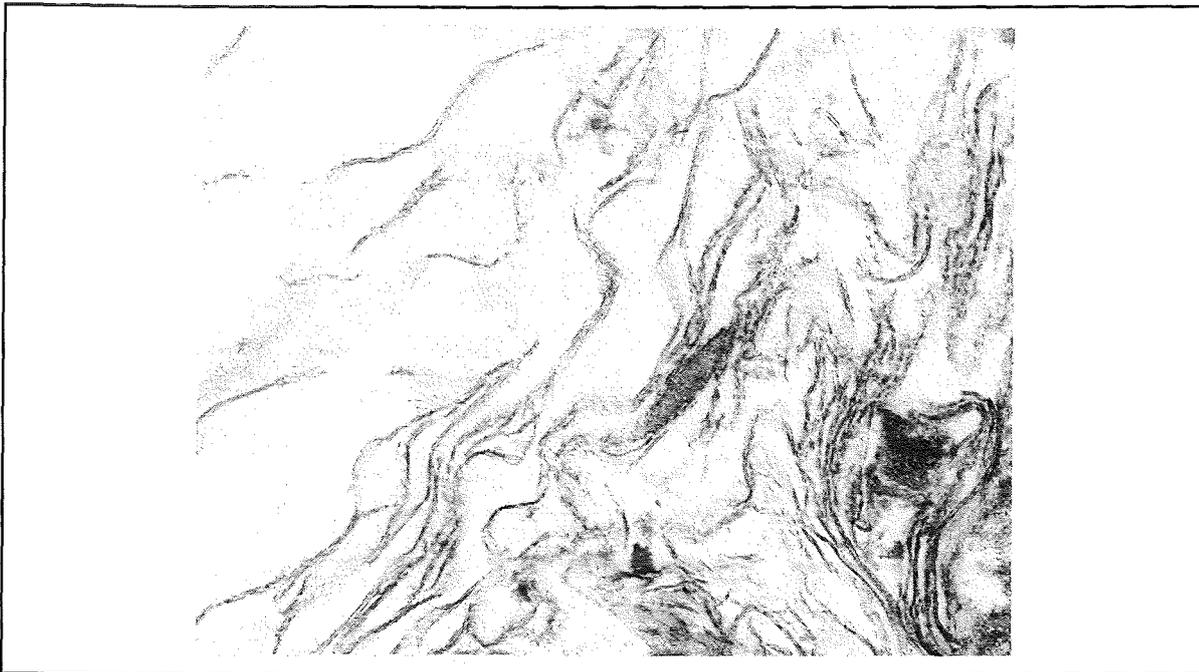


Abb. 20 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Vesikeln, die sich aus C_6 -NBD-PC zusammensetzen.
Maßstab: $\text{---} \hat{=} 260 \text{ nm}$.

3.2 Untersuchungen zum Ein- und Umbau der Lipide in zelluläre Systeme

3.2.1 Mikroskopische Untersuchungen

3.2.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

Bei Suspensionskulturen wie zum Beispiel der untersuchten HL-60 Zelllinie lassen sich nur glutaraldehyd-fixierte Zellen einfach und schnell fokussieren. Unterschiede zwischen den einzelnen Vesikelzusammensetzungen sind bei den Zellen besonders bezüglich der Helligkeit, aber auch bezüglich der anfärbbaren Strukturen festzustellen.

Inkubiert man die Zellen mit C_6 -NBD-PC, so erscheint im Mikroskop das ganze Zytoplasma diffus leuchtend (Abb. 21 a und b). Dunklere Stellen in Zellkernbereichen sind vereinzelt zu erkennen. Auffällig ist, daß die Plasmamembran deutlich fluoresziert. Die Gesamtfluoreszenz, die die Aufnahme widerspiegelt, ist bei dieser Inkubation recht hoch.

Zellen, die mit C_6 -NBD-PA inkubiert wurden, ergeben bereits bezüglich der Fluoreszenzverteilung ein anderes Bild (Abb. 21 c): Die Plasmamembran leuchtet deutlich weniger; die diffuse Färbung des Zytoplasmas besteht auch nicht in dem Maße wie nach der Inkubation mit C_6 -NBD-PC. Dafür finden sich im Zytoplasma hell fluoreszierende tröpfchenartige Strukturen.

C_6 -NBD-PS inkubierte Zellen haben unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anfärbung ein ähnliches Aussehen wie Zellen, die mit C_6 -NBD-PC inkubiert sind (Abb. 21 d).

Mit C_6 -NBD-DG oder C_6 -NBD-PE inkubierte Zellen zeichnen sich besonders dadurch aus, daß sich die Zellen nur recht wenig, bei C_6 -NBD-PE praktisch nicht anfärben lassen. Daher sieht man unter dem Mikroskop bei geringen Gesamthelligkeiten viele von Partikeln "angestrahlte" Zellen, die aber selbst nicht fluoreszieren (Abb. 21 e).

Die mit NBD markierte Fettsäure färbt ebenfalls sowohl undifferenzierte als auch differenzierte HL-60 Zellen in ähnlicher Weise wie C_6 -NBD-PC (Abb. 21 f).

Abb. 21 a bis f Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen nach Inkubation für jeweils 1 Stunde bei 4 °C mit Vesikeln aus verschiedenen mit dem Fluorophor NBD markierten Lipiden.

Maßstab: a und f :  $\hat{=} 16 \mu\text{m}$
 b, c, d und e :  $\hat{=} 20 \mu\text{m}$

- a: Inkubation von unfixierten Zellen mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PC und Lezithin
- b: Inkubation von glutaraldehyd-fixierten Zellen mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PC
- c: Inkubation von glutaraldehyd-fixierten Zellen mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PA
- d: Inkubation von glutaraldehyd-fixierten Zellen mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PS
- e: Inkubation von glutaraldehyd-fixierten Zellen mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PE
- f: Inkubation von unfixierten Zellen mit Vesikeln aus C_6 -NBD-FS

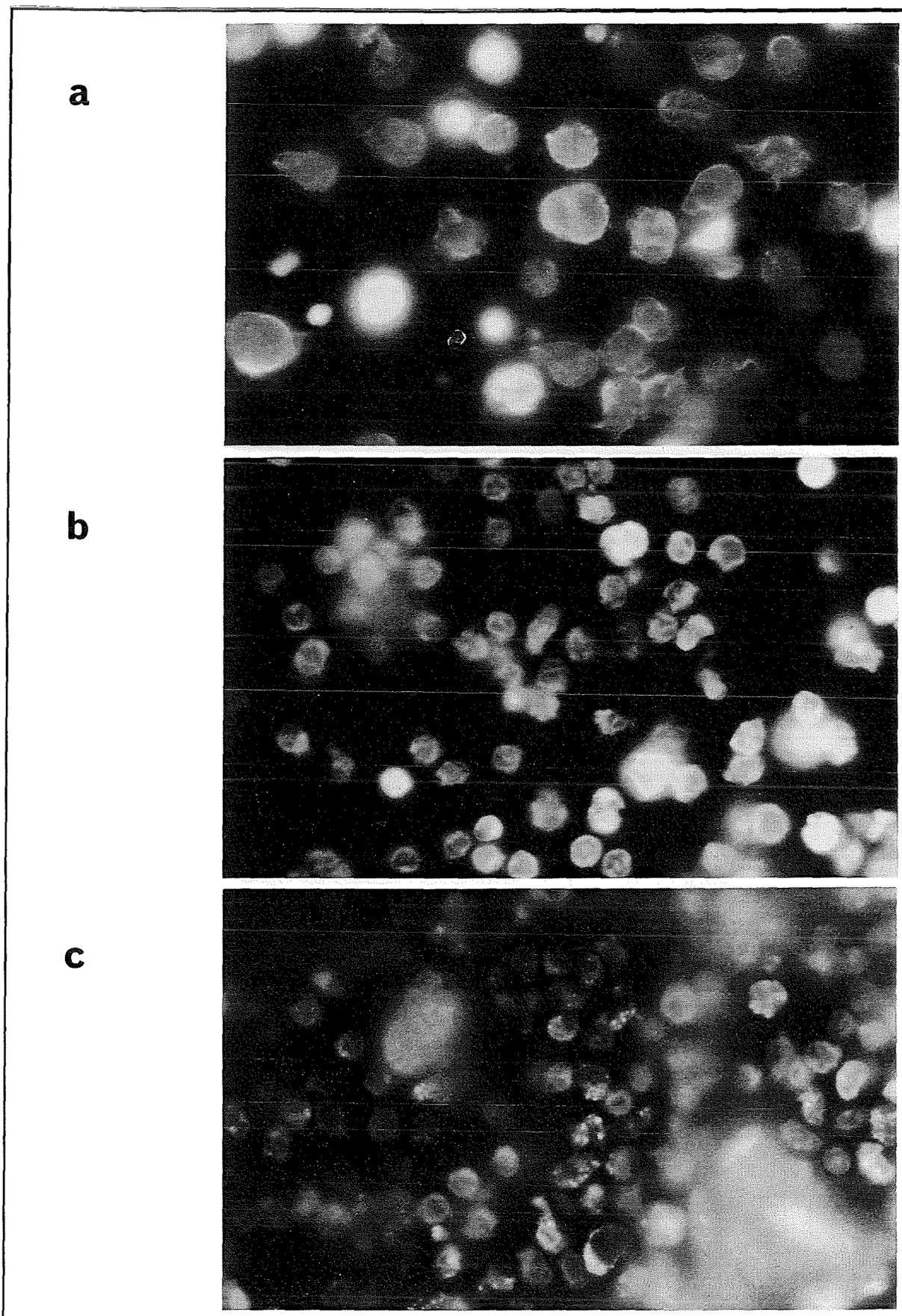


Abb. 21 a-c

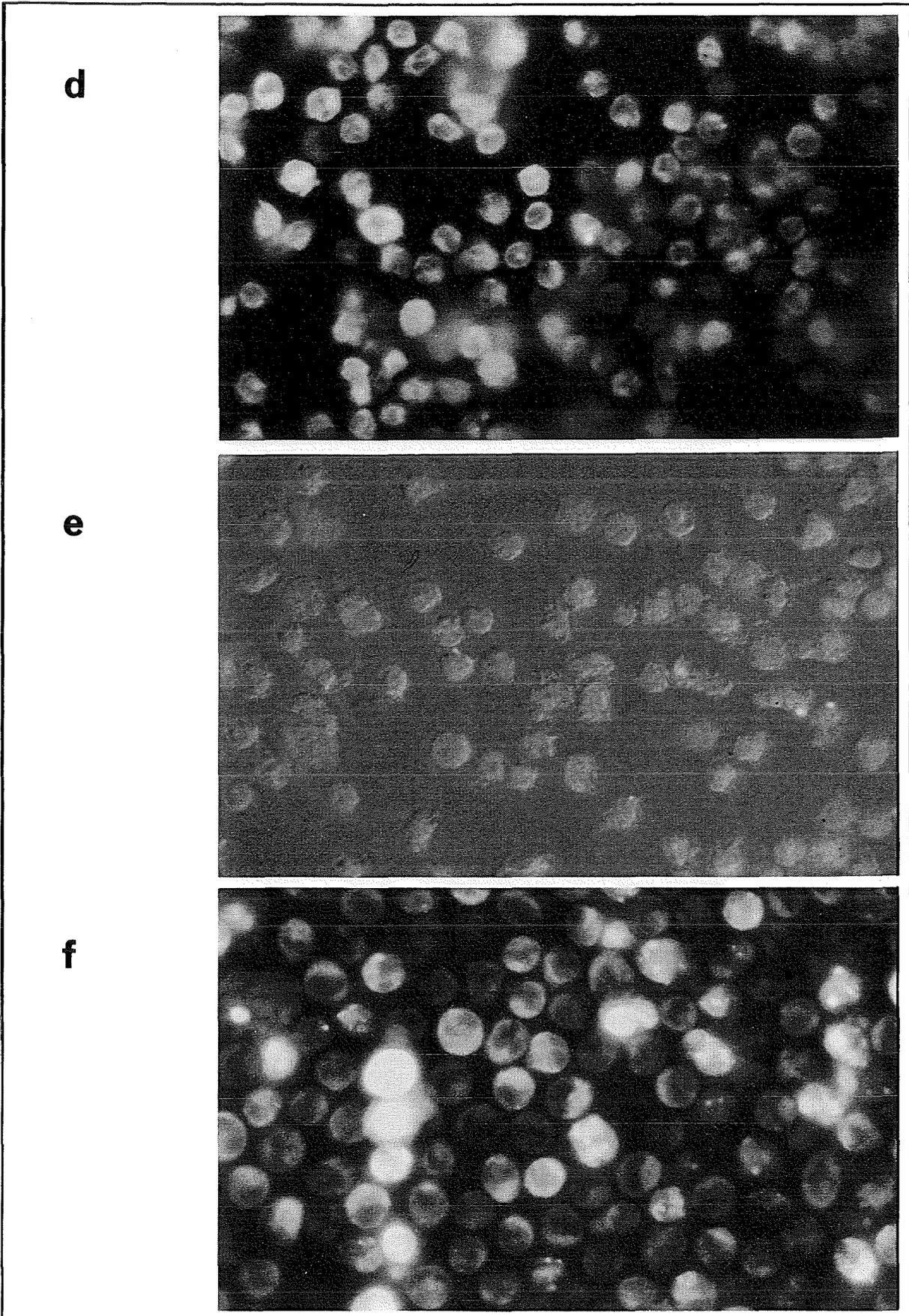


Abb. 21 d-f

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen eignen sich besonders Kulturen, die einen Monolayer ausbilden. Gerade die mit Vesikeln inkubierten NG- und NFB-Zellen ergeben daher sehr aussagekräftige Bilder.

Sowohl bei NG- als auch bei NFB-Zellen können die Beobachtungen, die bei HL-60 Zellen bezüglich der Behandlung mit C_6 -NBD-PC und C_6 -NBD-PA gemacht werden, bestätigt werden: Nach Inkubation mit C_6 -NBD-PC ist die starke Färbung der Plasmamembran und die schwächere, diffuse Färbung des Zytoplasmas deutlich zu erkennen (Abb. 22 a, b und c). Der nicht gefärbte Zellkern hebt sich, gerade bei den NFB-Zellen, deutlich hervor. Er ist, bedingt durch die helle darüber bzw. darunterliegende Plasmamembran, jedoch nicht ganz dunkel.

Nach einer Inkubation mit C_6 -NBD-PA ist bei diesen Zellen, wie bereits bei den HL-60 Zellen, die Plasmamembran nur sehr geringfügig gefärbt (Abb. 23 a und b). Daher ist der Zellkern, der auch hier nicht fluoresziert, noch dunkler. Das Zytoplasma ist nicht diffus, sondern gekörnt gefärbt.

Weitere Strukturen innerhalb des Zytoplasmas lassen sich bei allen drei Zellarten mit dieser Auflösung nicht erkennen.

Abb. 22 (umseitig) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NFB- und NG-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln bestehend aus C_6 -NBD-PC und Lezithin für jeweils 1 Stunde bei 4 °C.

a: Inkubation von NFB-Zellen; Maßstab:  $\hat{=} 20 \mu\text{m}$

b: Inkubation von NG-Zellen; Maßstab:  $\hat{=} 16 \mu\text{m}$

c: Inkubation von NG-Zellen; Maßstab:  $\hat{=} 25 \mu\text{m}$

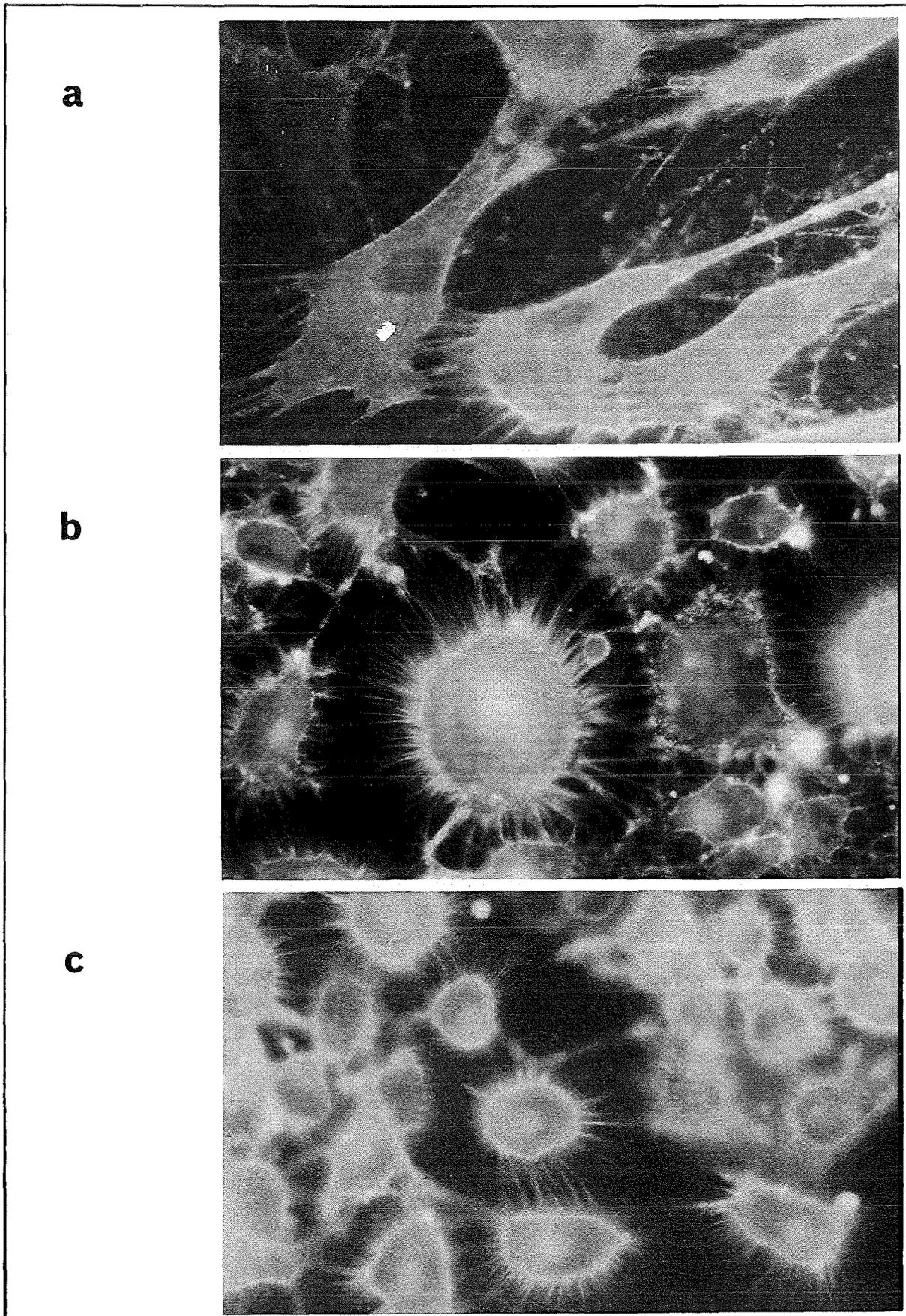


Abb. 22a-c

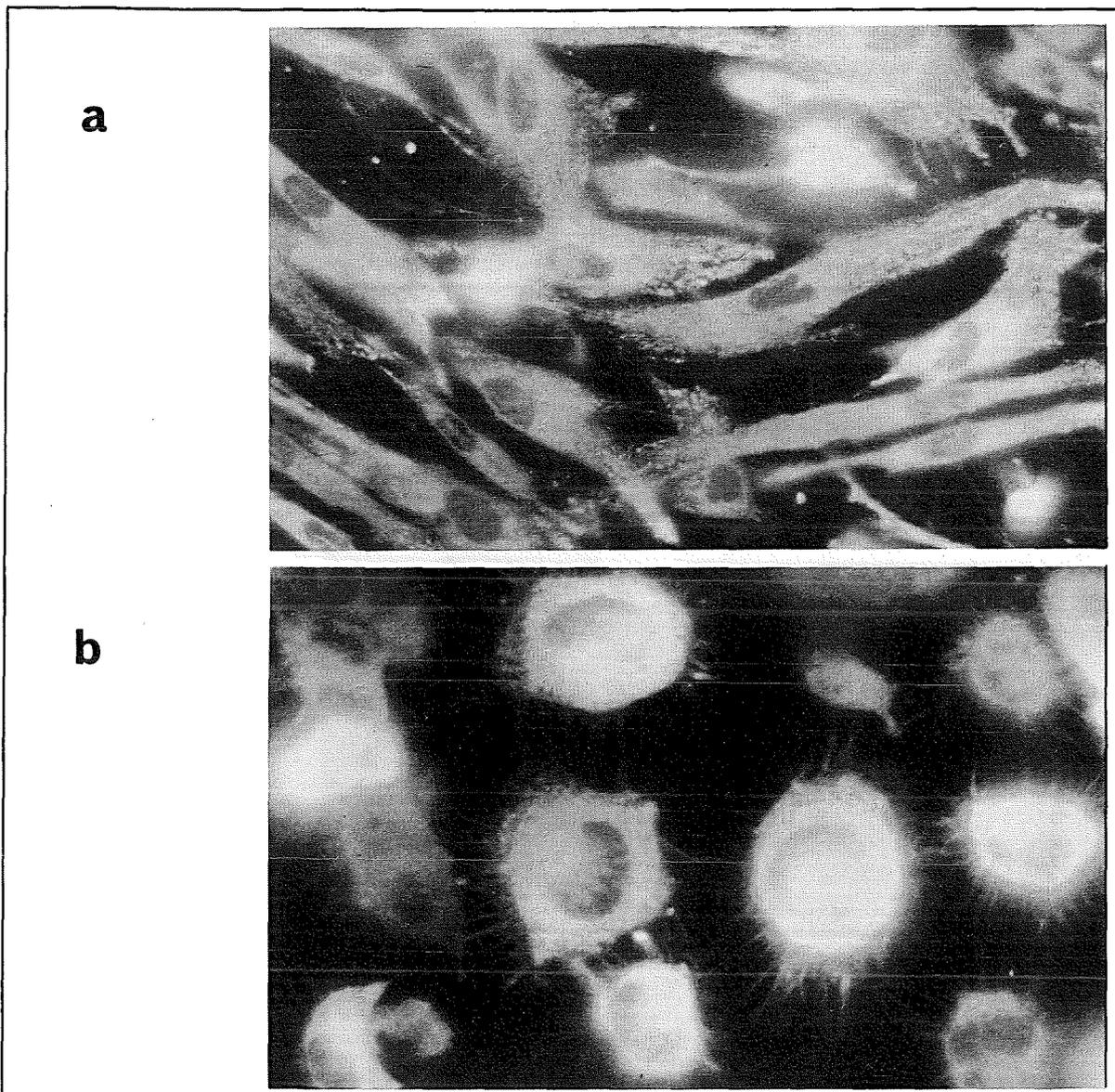


Abb. 23 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NFB- und NG-Zellen nach Inkubation für jeweils 1 Stunde bei 4 °C mit Vesikeln bestehend aus C₆-NBD-PA.

a: Inkubation von NFB-Zellen; Maßstab: $\hat{=}$ 25 μ m

b: Inkubation von NG-Zellen; Maßstab: $\hat{=}$ 25 μ m

Speziell bei den in Suspension wachsenden HL-60 Zellen bedeutet die Anwendung des Laserscanmikroskops eine wichtige Verbesserung gegenüber der Durchlichtmikroskopie. Erst durch diese Untersuchung kann eindeutig die Aufnahme der fluoreszierenden Vesikel belegt werden. Abb. 24 zeigt exemplarisch eine Aufnahme nach Inkubation mit C_6 -NBD-PC. Die Unregelmäßigkeit der zellulären Oberfläche ausdifferenzierter HL-60 Zellen läßt jedoch auch bei dem schichtweisen Durchscannen keine Aussagen bezüglich der räumlichen Verteilung nach Aufnahme der fluoreszierenden Lipide zu.

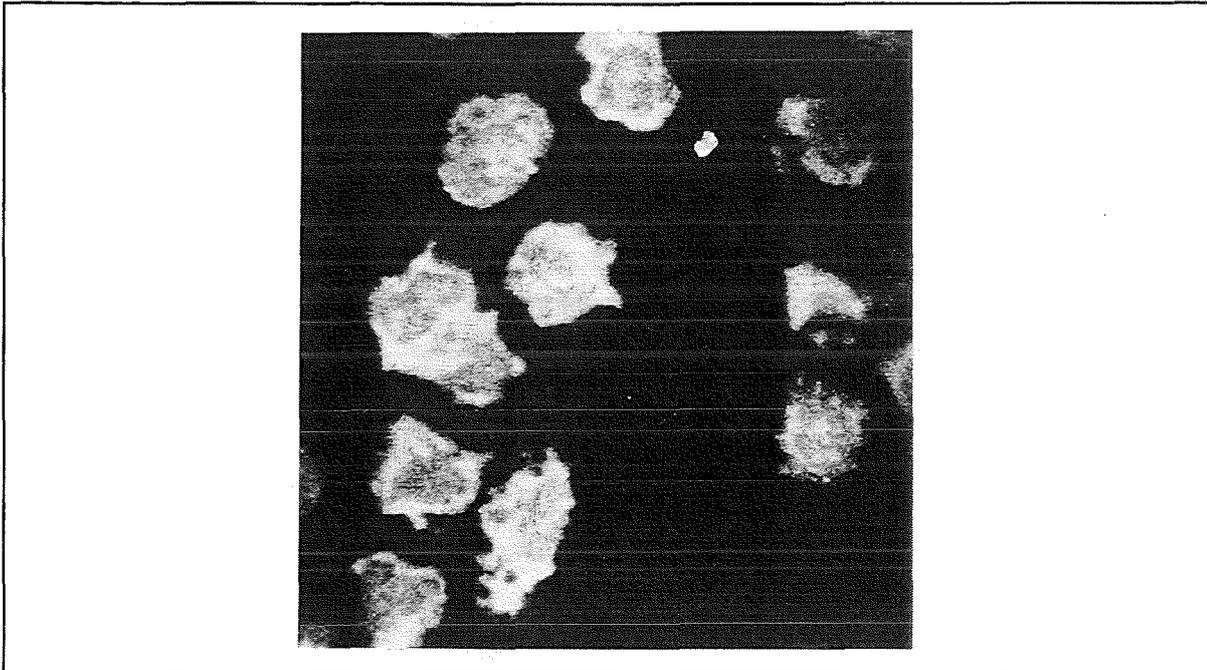


Abb. 24 Laserscanmikroskopisches Bild von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen nach Inkubation mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PC für 1 Stunde bei 4 °C.

Maßstab: $\text{—} \hat{=} 4,7 \mu\text{m}$

Die durch diese Untersuchungen gewonnenen Bilder nach Inkubation von NG- und NFB-Zellen bestätigen in ihrer Aussage die Ergebnisse der Untersuchungen mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie. Beide Substanzen werden aufgenommen, wobei C_6 -NBD-PC tatsächlich hauptsächlich an der Plasmamembran und diffus im Zytoplasma (Abb. 25), C_6 -NBD-PA im Zytoplasma wiederzufinden ist (Abb. 26). Bei vielen dieser Zellen sind zudem runde Bereiche festzustellen, die nicht gefärbt sind. Von Größe und Form lassen sie Vakuolen vermuten, die offensichtlich die fluoreszenzmarkierten Substanzen nicht aufnehmen. Daß es sich dabei um Oberflächenphänomene handelt, ist nicht durch diese Untersuchungsmethode ersichtlich, sondern wurde durch ultraschall- bzw. rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen geklärt.

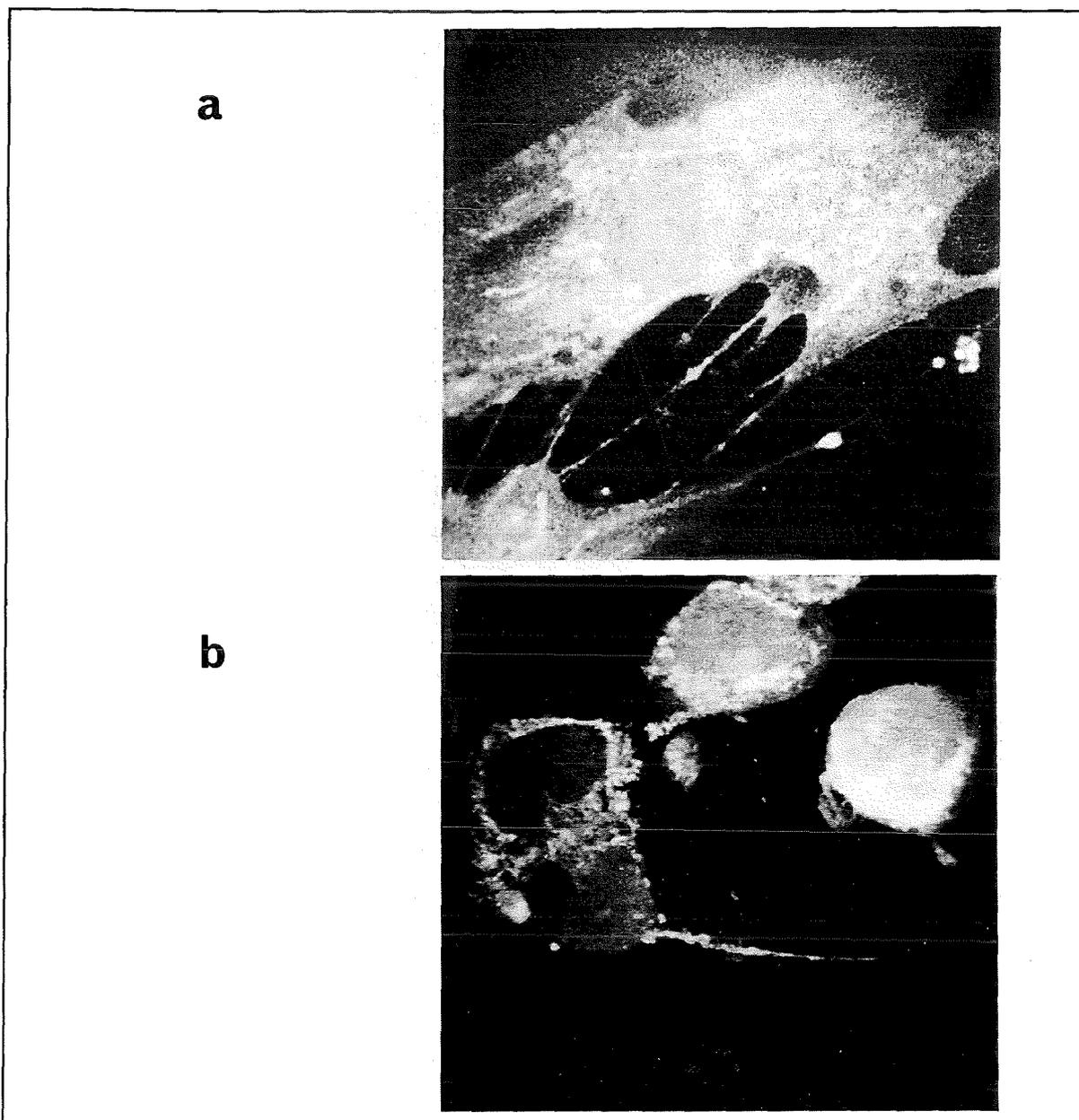


Abb. 25 Laserscannmikroskopische Bilder von NFB- und NG-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PC für jeweils 1 Stunde bei 4 °C.

Maßstab: |——| $\hat{=}$ 5,7 μ m

a: Inkubation von NFB-Zellen

b: Inkubation von NG-Zellen

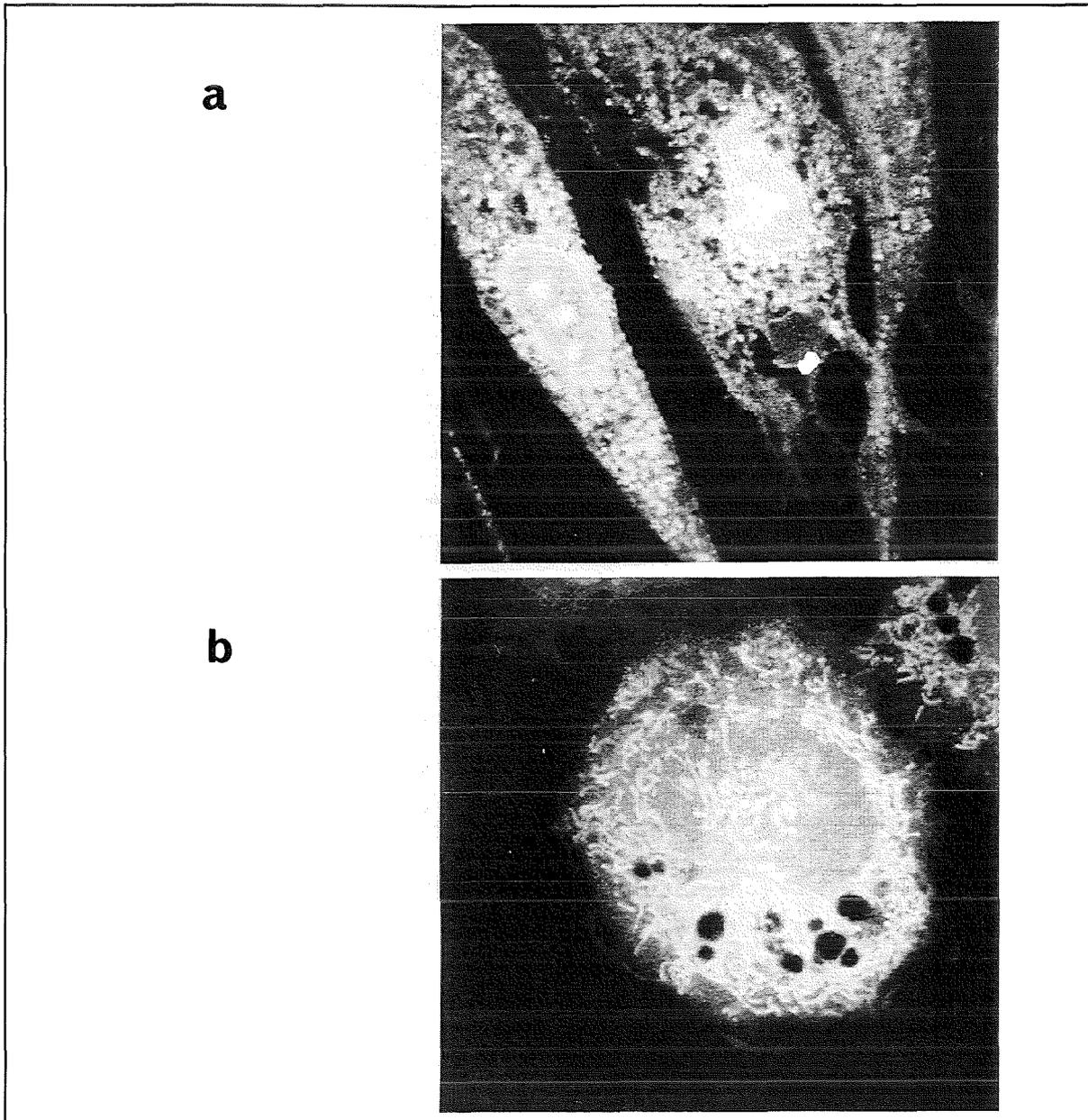


Abb. 26 Laserscanmikroskopische Bilder von NFB- und NG-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln aus C₆-NBD-PA für jeweils 1 Stunde bei 4 °C.

Maßstab: |——| $\hat{=}$ 5,7 μm

a: Inkubation von NFB-Zellen

b: Inkubation von NG-Zellen

3.2.1.2 Elektronenmikroskopie

Untersucht man HL-60 Zellen mit Hilfe des Transmissionselektronenmikroskops, so ergeben Zellen, die mit Vesikeln inkubiert wurden, das gleiche Bild wie Kontrollzellen (Abb. 27 beispielhaft mit C_6 -NBD-PC inkubierte HL-60 Zellen). Sowohl an der Plasmamembran als auch im Zellinneren finden sich keinerlei Strukturen, die elektronenmikroskopisch die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Lipide belegen. Die Vesikel selbst sind durch die für die Zellen notwendige geringe Umdrehungszahl bei der Zentrifugation in den Schnitten nicht enthalten.

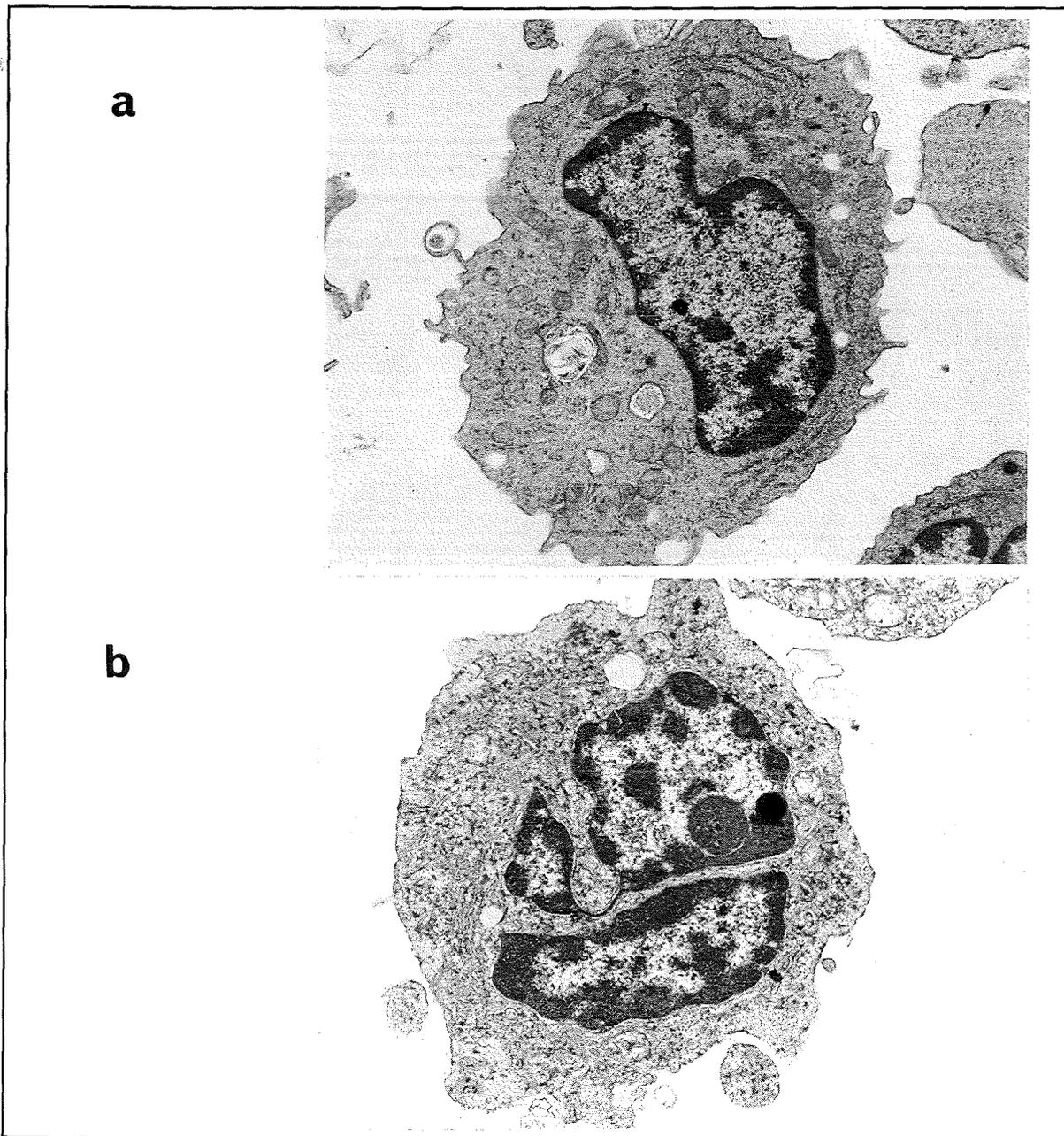


Abb. 27 Elektronenmikroskopische Bilder von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen nach Inkubation mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PC für 1 Stunde bei 4 °C.

a: Kontrollzellen; Maßstab: $\text{---} \hat{=} 4 \mu\text{m}$

b: Inkubation mit Vesikeln aus C_6 -NBD-PC; Maßstab: $\text{---} \hat{=} 4 \mu\text{m}$

Wie schon bei den HL-60 Zellen lassen sich elektronenmikroskopisch zwischen mit Vesikeln inkubierten NG-Zellen bzw. NFB-Zellen und Kontrollzellen keinerlei Unterschiede finden (Abb. 28 und Abb. 29).

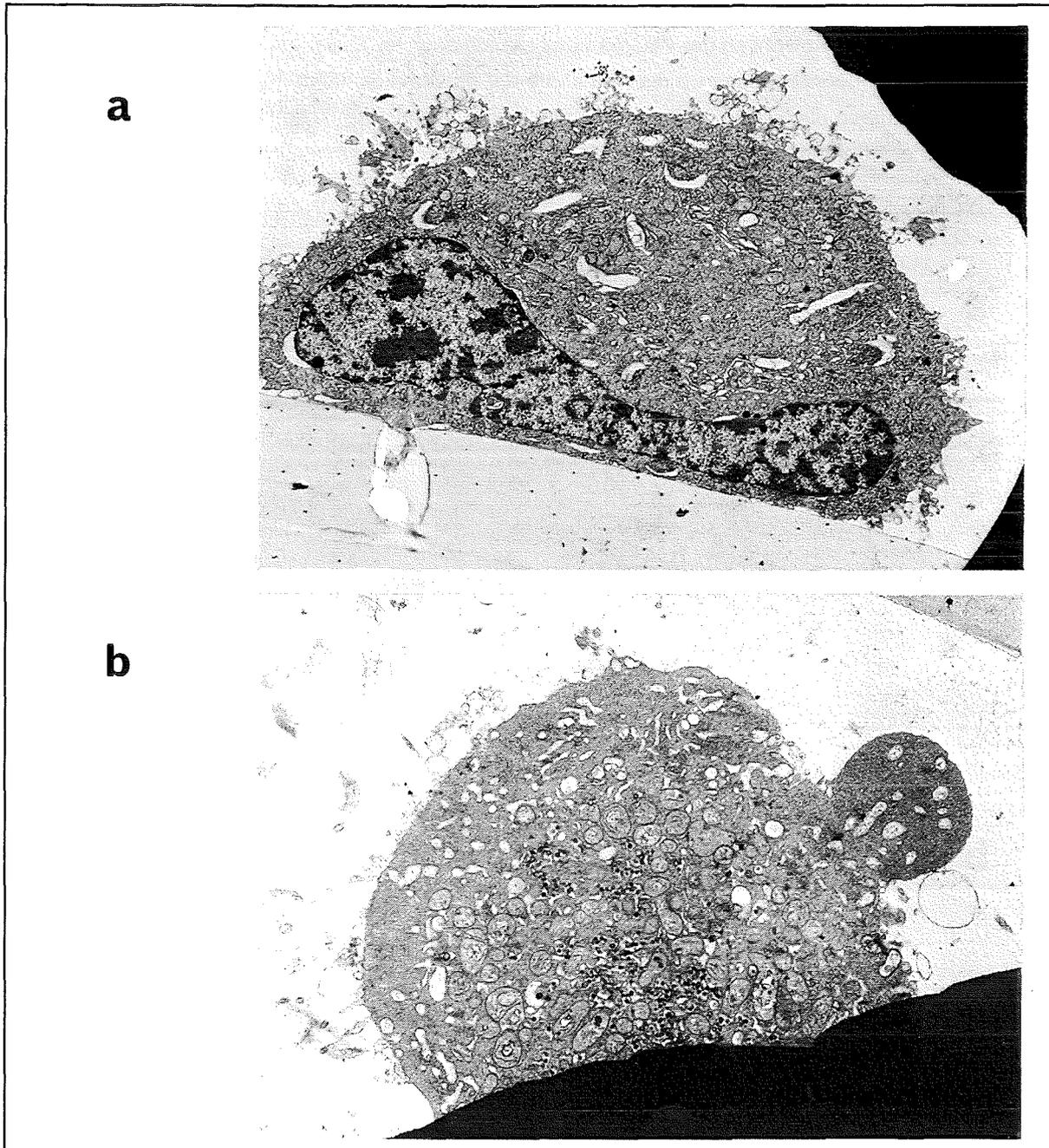


Abb. 28 Elektronenmikroskopische Bilder von NG-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln aus C₆-NBD-PC für 1 Stunde bei 4 °C.

Maßstab: |——| $\hat{=}$ 7,6 μ m

a: Kontrollzellen

b: Inkubation mit Vesikeln aus C₆-NBD-PC

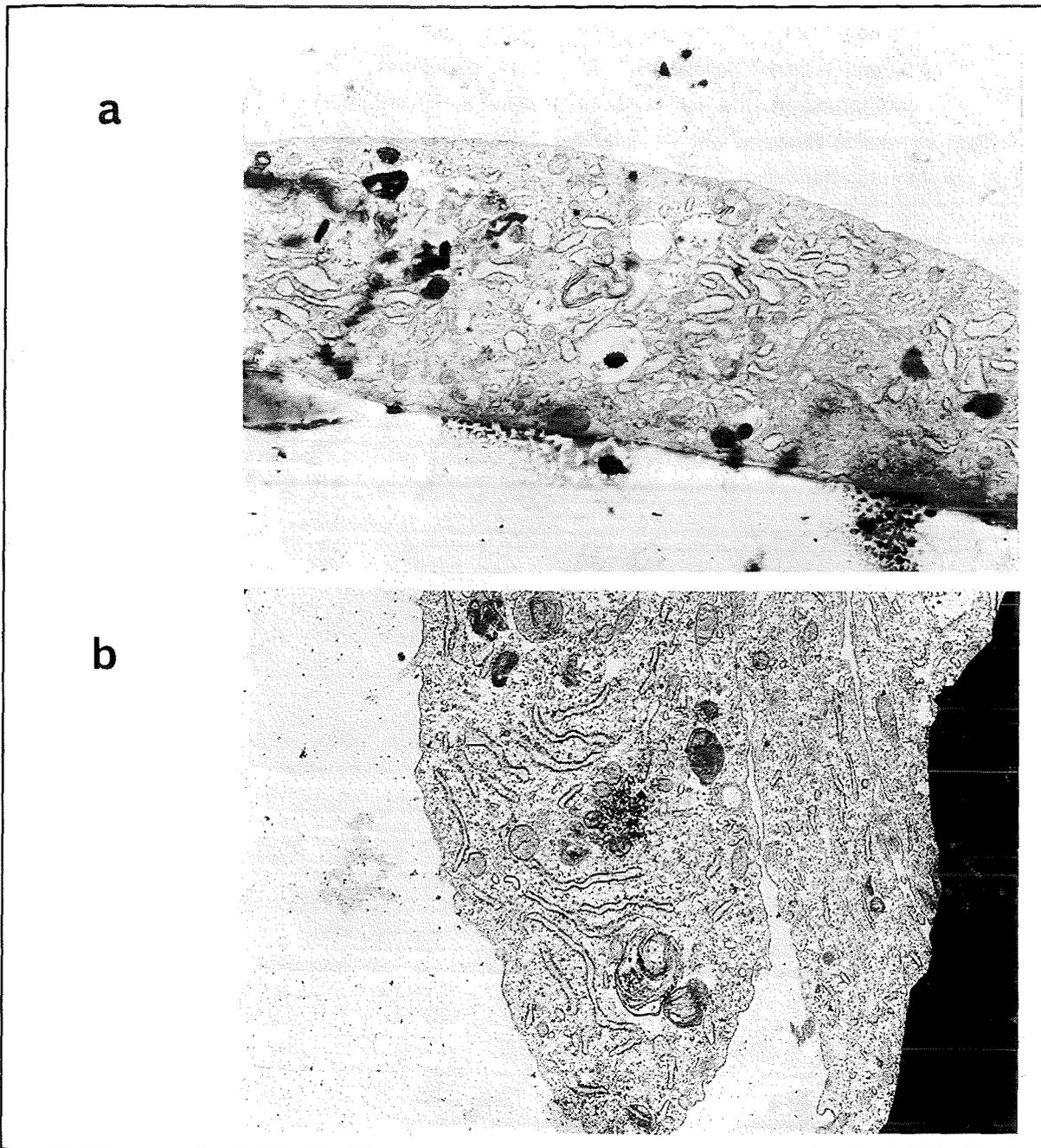


Abb. 29 Elektronenmikroskopische Bilder von NFB-Zellen nach Inkubation mit Vesikeln aus C₆-NBD-PC für 1 Stunde bei 4 °C.

Maßstab: |——| $\hat{=}$ 4 μ m

a: Kontrollzellen

b: Inkubation der Zellen mit Vesikeln aus C₆-NBD-PC

Betrachtet man NFB-Zellen im Rasterelektronenmikroskop, so zeigen sie eine recht glatte, unstrukturierte Oberfläche (Abb. 30 a). Als primäre Fibroblasten hat ihr Aussehen epithelartigen Charakter. NG-Zellen haben hingegen an der Zelloberfläche viele kurze pseudopodienartige Fortsätze (Abb. 30 b). Da diese Zellen undifferenziert sind, bilden sie noch keine synapsenähnliche Strukturen. Bei diesen Bildern zeigen sich keine Hinweise auf Vesikel oder vesikelartige Strukturen an der Plasmamembran der Zellen, die den unbehandelten Kontrollen gleich sind.

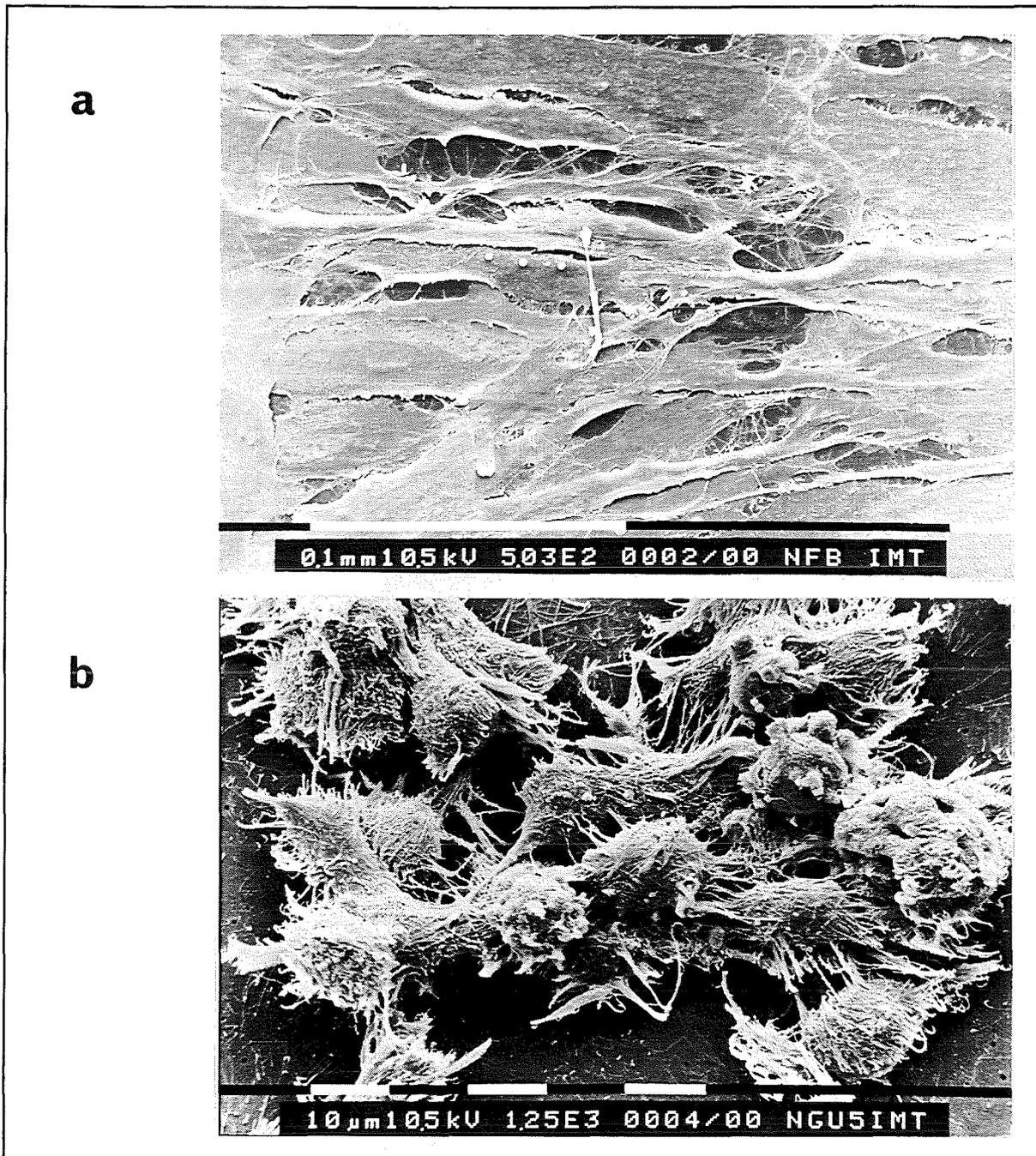


Abb. 30 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von NFB- und NG-Zellen.

- a) NFB-Zellen
- b) NG-Zellen

3.2.2 Aufnahme extern zugegebener Lipide

Die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Lipide liegt bei allen Zellen nach der einstündigen Inkubationsdauer in einem Bereich von 20 bis 50 % der angebotenen Substanzen (Abb. 31). Ausgenommen ist dabei die Aufnahme von C_6 -NBD-PA in HL-60 Zellen. Sie liegt mit über 70 % deutlich höher. Allgemein ist die Aufnahme dieser Substanz in alle anderen Zellen um mindestens 10 % höher als die von C_6 -NBD-PC und C_6 -NBD-PS. Letztgenannte nehmen beide ähnlich viel auf (ungefähr 30 %). Um eine Aufnahme von C_6 -NBD-DG zu erreichen, mußte gleichzeitig auch C_6 -NBD-PA verabreicht werden. Durch diese Kombination mit C_6 -NBD-PA ist die Menge an aufgenommenem C_6 -NBD-DG mit 50 % ebenfalls recht hoch.

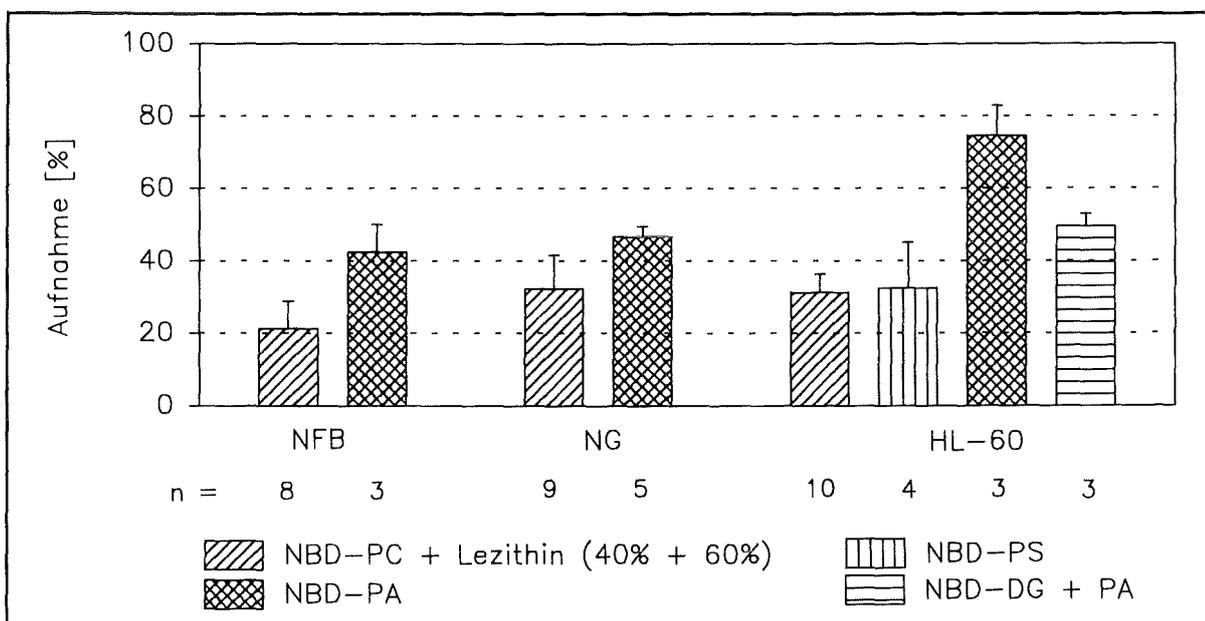


Abb. 31 Aufnahme NBD-markierter Lipide in NFB-, NG- und DMSO-differenzierten HL-60 Zellen nach einstündiger Inkubation.

Gesamte Menge der angebotenen fluoreszierenden Substanz = 100 %
Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n nach Angabe)

Zur Bestimmung der Aufnahme radioaktiv markierter Lipide werden verschiedene Berechnungen zugrunde gelegt. Die Ergebnisse dazu sind zusammenfassend in Abb. 32 dargestellt.

Bestimmt man die gesamte im Versuch verbliebene Radioaktivität durch Aufsummierung der Aktivitäten in Zellen und Inkubationsüberstand (dargestellt als Säule 1), so zeigt sich, daß diese in allen Fällen über 80 % liegt. Die Ausnahme stellt das mit 3H -markierte und damit schwieriger zu messende Pal- 3H -PC dar. Dessen Aufnahme liegt bei ungefähr 75 %.

Wird jedoch nur die Aufnahme von radioaktiv markierten Lipiden in die Zellen (dargestellt als Säule 2) betrachtet, so ergibt sich ein deutlich schlechteres Bild: Alle radioaktiv markierten Lipide werden im Gegensatz zu radioaktiv markierter Ara (Abb. 33), deren Aufnahme nach 24 Stunden bereits abgeschlossen ist, relativ schlecht internalisiert. Extrem ist dies bei undifferenzierten HL-60 Zellen (Aufnahme von

unter 10 %). Darüberhinaus wird das ^{14}C -PC mit Ara an der *sn*-2 Position auch von differenzierten Zellen schlecht aufgenommen (ebenfalls unter 10 %). Differenzierte Zellen nehmen sowohl ^{14}C -PC als auch ^3H -PC mit Pal an der *sn*-2 Position zu ungefähr 50 % der im Versuch vorhandenen Aktivitätsmenge auf. Die Aufnahme von ^{14}C -markiertem PE, welches an der *sn*-2 Position Ara trägt, ist dagegen mit nahezu 80 % der im Versuch verbleibenden Aktivität vergleichsweise sehr hoch.

Die nach Abtrennung des Überstandes an die Zellen gekoppelte Aktivität ist allerdings mindestens zu 50 % wasserlöslich, d.h. höchstens 50 % ist durch Lipidextraktion abtrennbar (dargestellt als Säule 3). Der Rest verbleibt in der wässrigen Phase der Extraktion. Bei ^{14}C -Ara-PE liegt auch dieser durch Lipidextraktion abtrennbare Anteil höher.

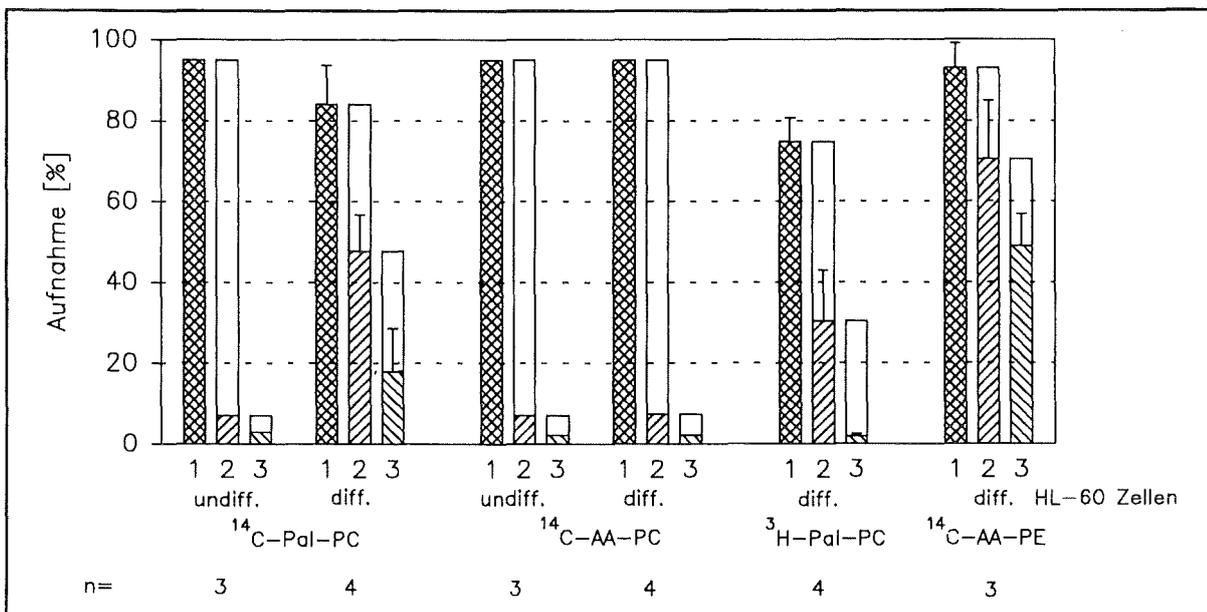


Abb. 32 Aufnahme radioaktiv markierter Lipide in undifferenzierte, sowie DMSO-differenzierte HL-60 Zellen nach einstündiger Inkubation.

Im Versuch eingesetzte Radioaktivität = 100 %; der Standard hierzu wird vor Inkubation aus der Inkubationslösung entnommen.

1 = Gesamtradioaktivität. Diese setzt sich zusammen aus:

2 = Radioaktivität in den Zellen (schraffiert) und im Medium (offen).

Die zelluläre Markierung teilt sich in:

3 = Lipidextrakt (schraffiert) und wässrigen Überstand (offen).

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n nach Angabe)

3.2.3 Turnover-Bestimmungen radioaktiv markierter Lipide in HL-60 Zellen

3.2.3.1 Turnover radioaktiv markierter Arachidonsäure

^{14}C -markierte Arachidonsäure wird von differenzierten HL-60 Zellen schon nach 24 Stunden vollständig in die Zellen eingebaut und hat, wie in Abb. 33 zu sehen ist, zu diesem Zeitpunkt auch bezüglich ihrer Verteilung einen Gleichgewichtszustand erreicht. Dieser sieht zahlenmäßig wie in Tab. 1 aufgeführt, aus:

	TG	PI	PS	PC	PE	Ara	PA
^{14}C -Aktivität [%] nach 24 Stunden	1,6 $\pm 0,008$	2 ± 1	11,4 $\pm 0,6$	30,3 $\pm 0,6$	48,2 $\pm 0,7$	0,7 $\pm 0,1$	1,1 $\pm 0,08$
TG = Triglyzeride, PI = Phosphatidylinositol							

Tab. 1 Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in Zelllipide nach Inkubation differenzierter HL-60 Zellen mit ^{14}C -Arachidonsäure.

Radioaktiv markierte Arachidonsäure wird also hauptsächlich in PE und PC, in geringeren Mengen auch in PS eingebaut.

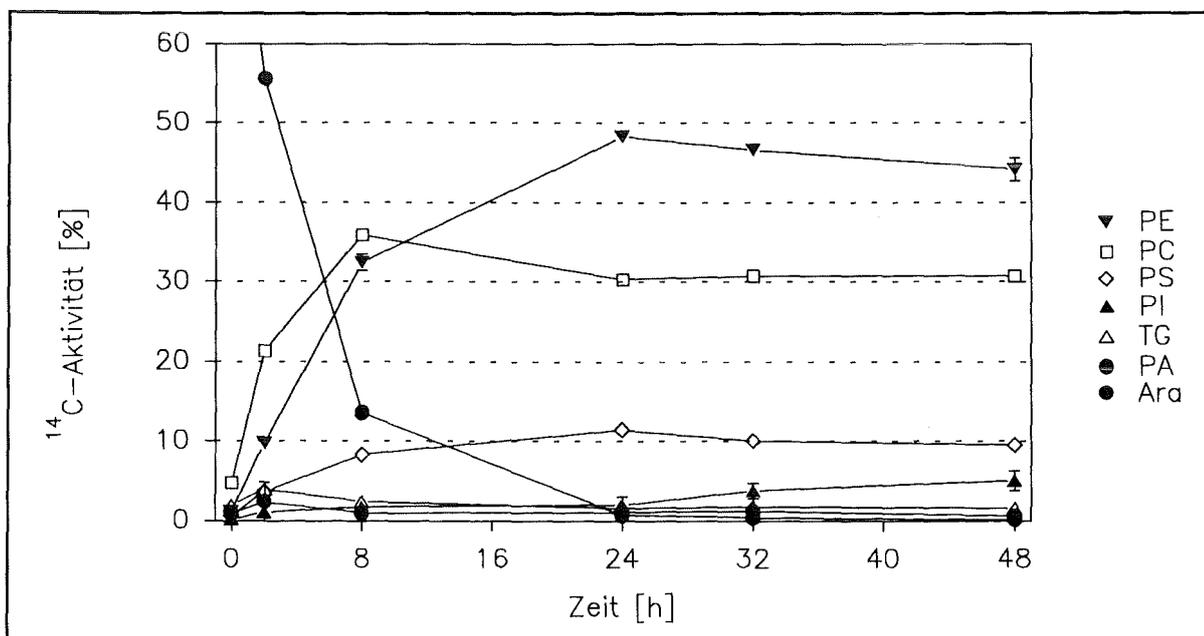


Abb. 33 Einbau extern zugegebener ^{14}C -Ara in Phospholipide DMSO-differenzierter HL-60 Zellen. Summe der Aktivitäten = 100 %
Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 6)

3.2.3.2 Turnover von radioaktiv markiertem PC, welches an der *sn*-2 Position Palmitinsäure trägt

PC mit Palmitinsäure an der *sn*-2 Position unterliegt keinerlei Umbau während einer 48stündigen Inkubation sowohl mit undifferenzierten (nicht dargestellt), als auch mit DMSO-differenzierten HL-60 Zellen. Dies zeigen Untersuchungen, bei denen zum einen die Kopfgruppe mit ^3H (nicht dargestellt), zum anderen die Fettsäure der *sn*-2 Position mit ^{14}C markiert ist (Abb. 34). Da sich die Lipide außer an der Markierungsstelle nicht weiter unterscheiden, ist das gleichartige Verhalten verständlich, unterstreicht aber nochmals, daß tatsächlich keine Veränderung der markierten Lipide stattfindet.

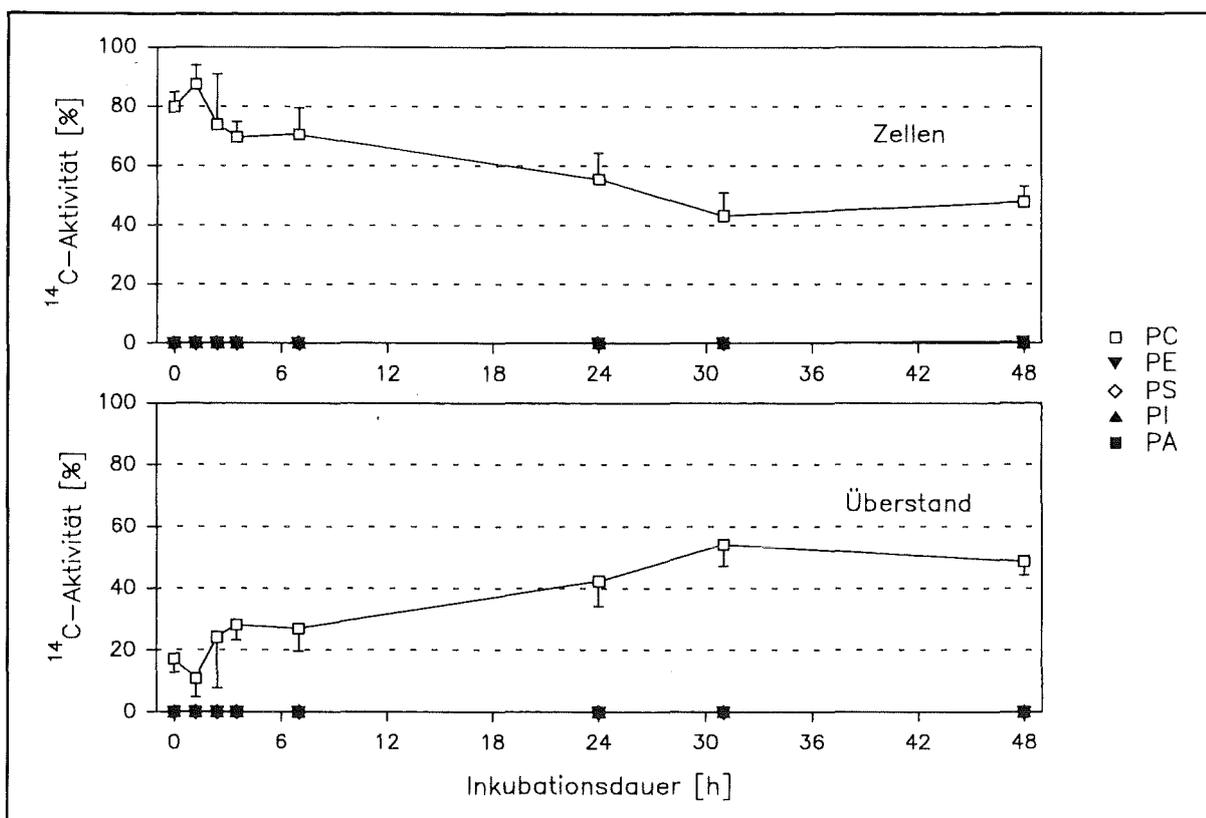


Abb. 34 Turnover-Untersuchung von ^{14}C -Pal-PC nach Inkubation von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen. Lipide von Zellen und Überständen wurden unabhängig voneinander aufgetrennt. Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$).

3.2.3.3 Turnover von radioaktiv markiertem PC, welches an der *sn*-2 Position Arachidonsäure trägt

Durch Inkubation des an der Fettsäure mit ^{14}C markierten Lipids mit undifferenzierten HL-60 Zellen über 48 Stunden wird ungefähr 20 % in radioaktiv markiertes PE umgewandelt (Abb. 35), wobei dieses Lipid hauptsächlich während der ersten 24 Stunden gebildet wird. PE ist in den Zellen vorhanden, wird also nicht nach außen transportiert. Anders ist dies bei dem zugegebenen radioaktiv markierten PC. Es ist das einzige im Überstand vorkommende radioaktiv markierte Lipid. Dieser Transport aus der Zelle in den Überstand, der ungefähr 28 % der Gesamtaktivität betrifft, findet ebenfalls hauptsächlich in den ersten 24 Stunden statt.

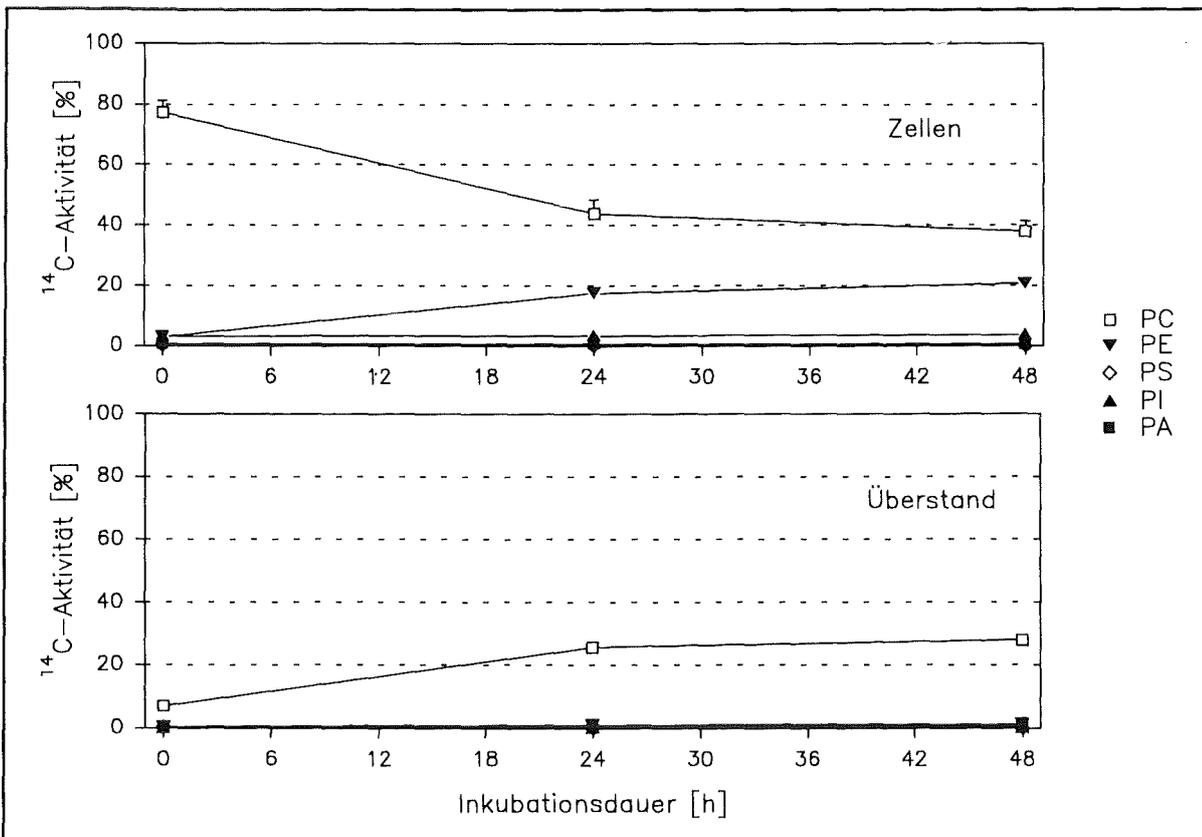


Abb. 35 Turnover-Untersuchung von ^{14}C -Ara-PC nach Inkubation von undifferenzierten HL-60 Zellen. Lipide von Zellen und Überständen wurden unabhängig voneinander aufgetrennt. Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$).

Der Umbau dieses radioaktiv markierten Lipids in differenzierten HL-60 Zellen ist gegenüber dem in undifferenzierten HL-60 Zellen (Abb. 36 im Vergleich zu Abb. 35) verringert. Es wird lediglich 13 % PE gebildet gegenüber 20 % bei undifferenzierten Zellen. Dabei bleibt die Summe an radioaktiv markierten Lipiden in den Zellen gleich, was bei dieser Berechnung gleichbedeutend ist mit einem entsprechend erhöhten Anteil an radioaktiv markiertem PC.

Durch die häufigeren Untersuchungszeiten bei dieser Versuchsserie läßt sich der Zeitpunkt des praktisch abgeschlossenen Umbaus bereits auf höchstens 7 Stunden nach Inkubationsbeginn ansetzen.

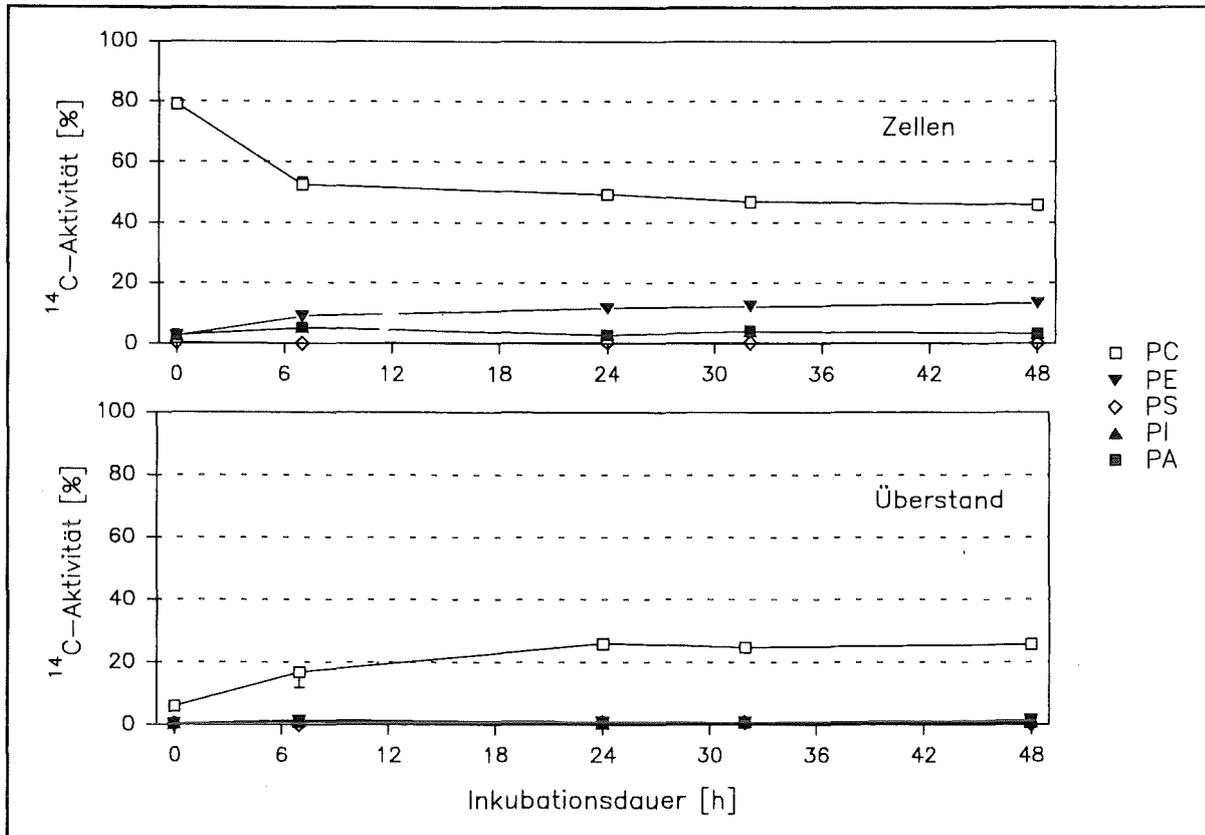


Abb. 36 Turnover-Untersuchung von ^{14}C -Ara-PC nach Inkubation von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen. Lipide von Zellen und Überständen wurden unabhängig voneinander aufgetrennt. Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$).

3.2.3.4 Turnover von radioaktiv markiertem PE, welches an der *sn*-2 Position Arachidonsäure trägt

PE, welches an der *sn*-2 Position ^{14}C -markierte Arachidonsäure trägt, zeigt, wenn man es während der gesamten Inkubationszeit auf den Zellen beläßt, eine Umverteilung der Radioaktivität in andere Lipide (Abb. 37). Die Umverteilung findet dabei hauptsächlich in den ersten Stunden statt. In dieser Zeit sinkt auch der Gehalt an radioaktiv markiertem PE im Überstand. Betrachtet man die Verteilung der aufgenommenen Aktivität zwischen den Zelllipiden nach 7 Tagen, so findet sich, jeweils radioaktiv markiert, PE noch zu 22 %, PC dagegen gleichbleibend zu 10 % und PS zu 4 %.

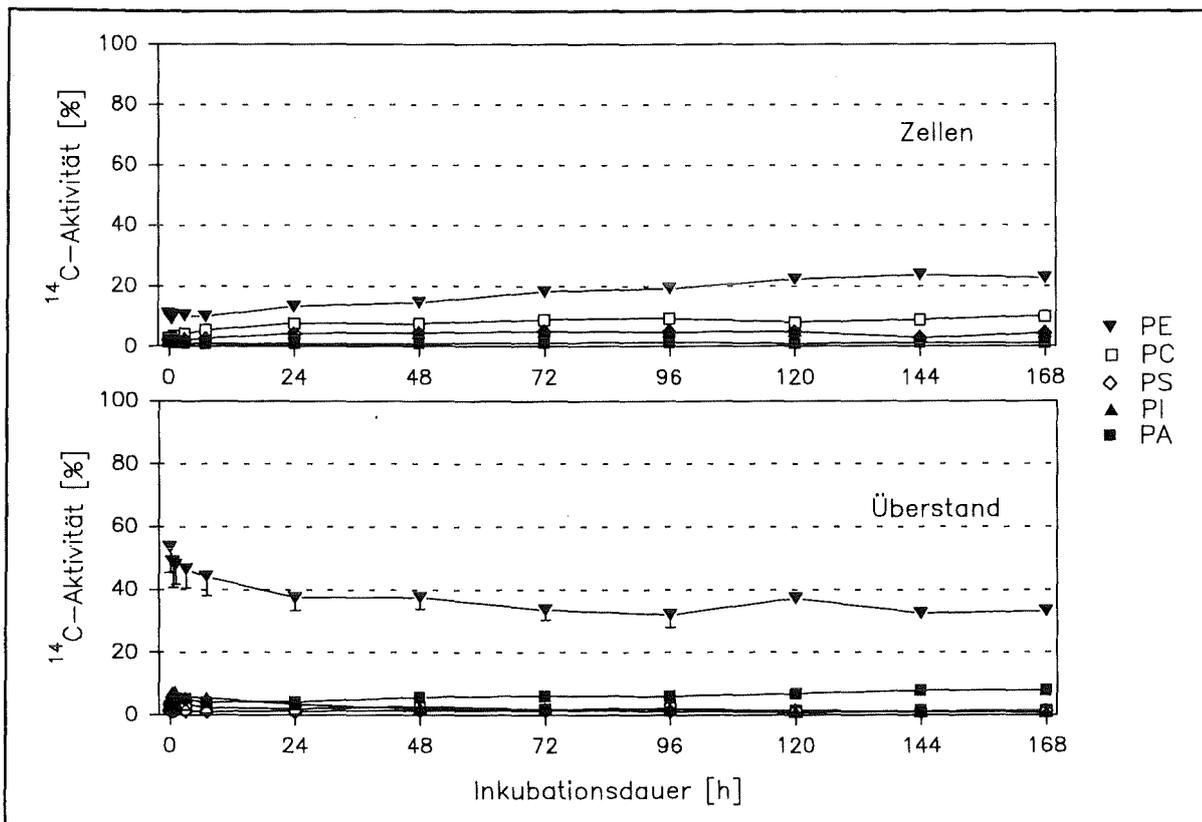


Abb. 37 Turnover-Untersuchung von ^{14}C -Ara-PE nach Inkubation von HL-60 Zellen. Markierung und Differenzierung mit DMSO waren zeitgleich. Lipide von Zellen und Überständen wurden unabhängig voneinander aufgetrennt.

Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$).

3.2.4 Turnover-Bestimmungen NBD-markierter Lipide in Zellen

3.2.4.1 Turnover von NBD-markiertem PC

Untersucht man den Einbau dieses Lipids in DMSO-differenzierten HL-60 Zellen nach der einstündigen Inkubation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, so zeigt sich, daß zunächst mehr als $1,4\text{ nmol}$ des PC nach Lipidextraktion der Zelllipide detektiert werden können. Davon befinden sich im Überstand ungefähr 300 pmol (Abb. 38 A). Während der Inkubationszeit von 3,5 Stunden kommt es zu einer starken Abnahme des fluoreszenz-

markierten PC, so daß nach dieser Zeit nur noch ungefähr 200 pmol in den Zellen und 100 pmol im Überstand gemessen werden können. Der Anstieg der fluoreszenzmarkierten Fettsäure im Überstand von 0 auf 200 pmol steht dabei in keinem Verhältnis zur Fluoreszenzabnahme des C₆-NBD-PC in den Zellen und spiegelt deutlich eine Abnahme des Fluorophors wider (siehe auch Abb. 15, Seite 38).

In C₆-NBD-PC markierten NG-Zellen kommt es während der 48stündigen Inkubation wie bei den HL-60 Zellen lediglich zu einem Abbau des C₆-NBD-PC zu C₆-NBD-FS (Abb. 38 B). Während der 48stündigen Inkubation wird das C₆-NBD-PC ebenfalls in recht großem Umfang abgebaut (von 1,6 nmol auf 95 pmol). Gleichzeitig steigt auch hier die Molmenge von C₆-NBD-FS im Überstand. Der Anstieg von 52 pmol auf 864 pmol erreicht aber ebenso wie oben beschrieben nicht das Ausgangsniveau des C₆-NBD-PC.

Bei NFB-Zellen, mit dem gleichen Lipid inkubiert, liegt nach 48 Stunden noch 260 pmol C₆-NBD-PC, also ein knappes Viertel der Ausgangsmenge, vor (Abb. 38 C). Die einzige neu auftretende fluoreszenzmarkierte Substanz ist, wie bei den anderen Zelllinien, C₆-NBD-FS. Sie ist auch wiederum der alleinig relevante Anteil an fluoreszierender Substanz im Überstand. Mit Abnahme des C₆-NBD-PC steigt sie und liegt nach 48 Stunden in einer absoluten Menge von 610 pmol vor. Damit findet sich auch bei Inkubation mit diesen Zellen eine zeitliche Korrelation zur Abnahme des Fluorophors.

Die Fluoreszenzverteilung zwischen Zellen und Überstand während der 3,5stündigen Inkubation von HL-60 Zellen nach Markierung mit C₆-NBD-PC zeigt eine nahezu stetige Abnahme in den Zellen auf 50 % des Gesamtanteils (Abb. 39 A).

Bei NG-Zellen befindet sich hingegen am Ende der Inkubation nach 48 Stunden noch 22 % der Gesamtfluoreszenz in den Zellen (Abb. 39 B). Dabei findet die hauptsächliche Verschiebung während der ersten 8 Stunden statt.

NFB-Zellen beinhalten am Ende der 48stündigen Inkubation sogar noch 44 % der Gesamtfluoreszenz in den Zellen (Abb. 39 C). Dieser Anteil liegt deutlich höher, als er bei den NG-Zellen bzw. nach 48 Stunden bei den HL-60 Zellen zu erwarten wäre. Die hauptsächliche Verschiebung der Fluoreszenzanteile findet dabei während der ersten 24 Stunden statt, ist also gegenüber den NG-Zellen zeitlich nach hinten verschoben.

Abb. 38 Turnover-Untersuchung von C₆-NBD-PC nach Inkubation von unterschiedlichen Zellen. Lipide von Zellen und Überständen wurden unabhängig voneinander aufgetrennt.

Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler (n nach Angabe).

- A) DMSO-differenzierte HL-60 Zellen (n = 5)
- B) NG-Zellen (n = 6)
- C) NFB-Zellen (n = 5)

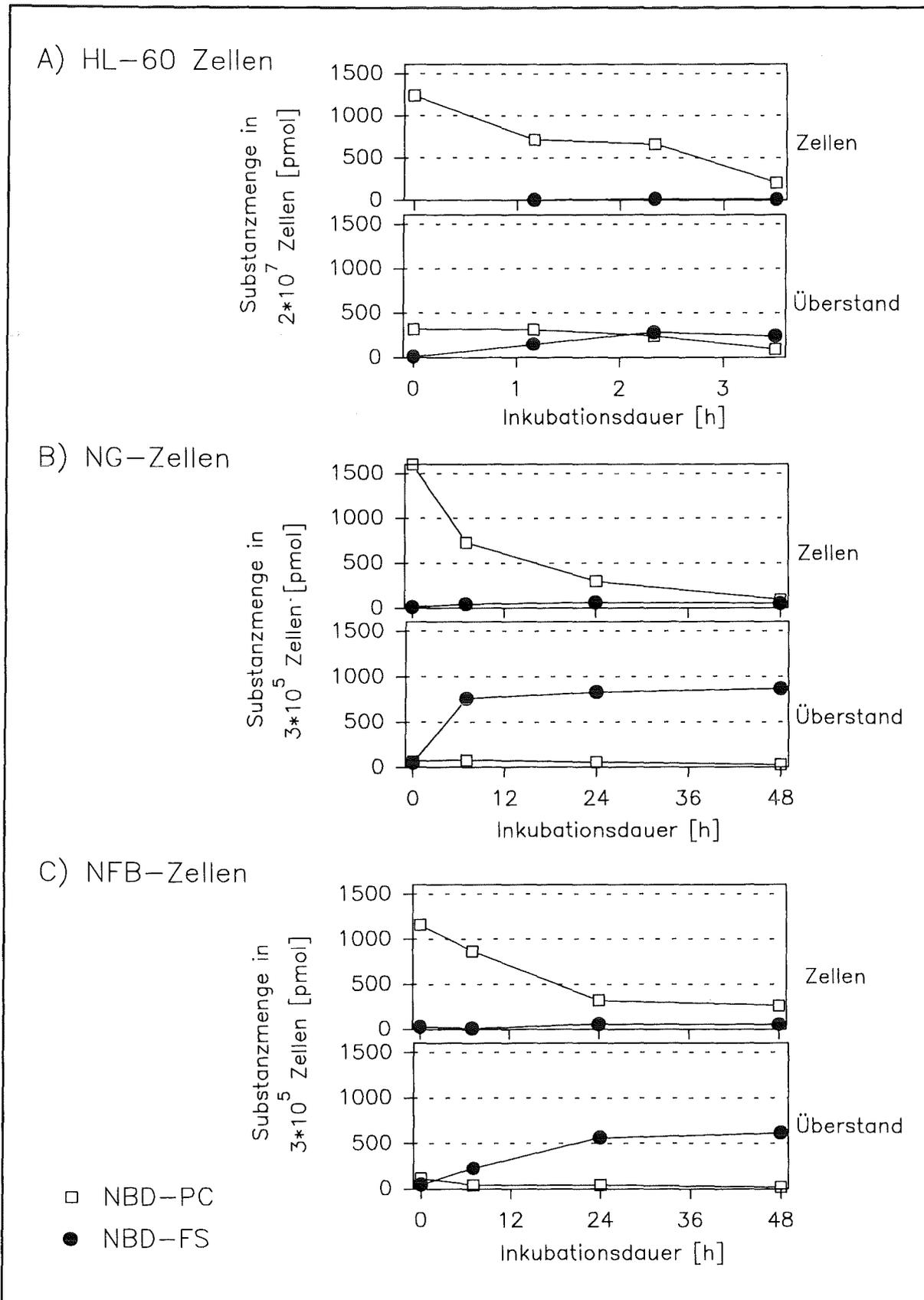


Abb. 38

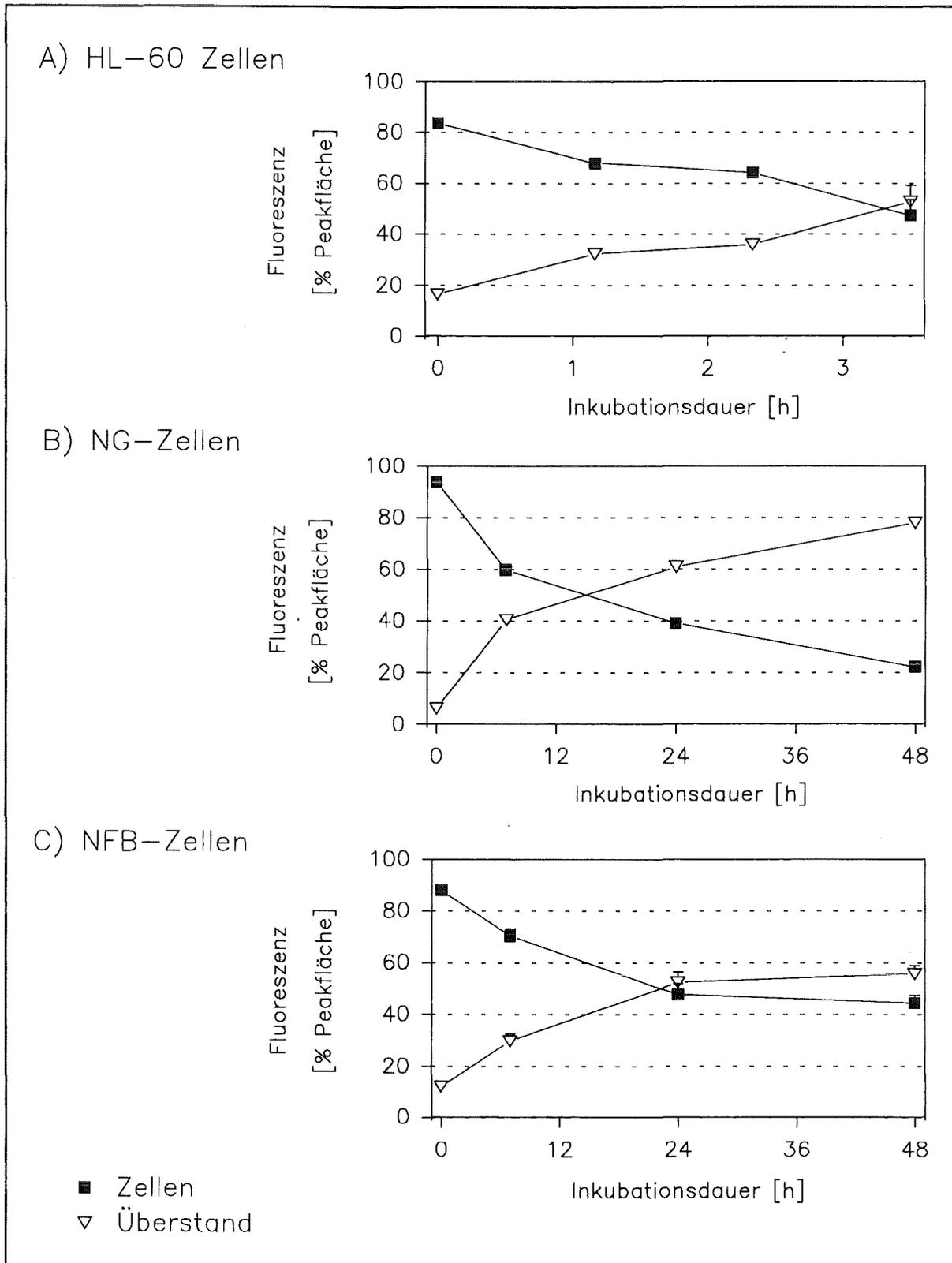


Abb. 39 Verteilung der Fluoreszenzintensität zwischen Zellen und Überstand nach Inkubation von unterschiedlichen Zellen mit C_6 -NBD-PC.

Summe der Fluoreszenzen zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n nach Angabe)

A) DMSO-differenzierte HL-60 Zellen (n = 5)

B) NG-Zellen (n = 6)

C) NFB-Zellen (n = 5)

3.2.4.2 Turnover von NBD-markiertem PA

NBD-markiertes PA wird im Gegensatz zum vorher dargestellten C₆-NBD-PC von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen nach 3,5stündiger Inkubation als Substrat für den Lipidmetabolismus verwendet. Dieses Lipid nimmt während der Inkubationszeit von 57 % auf 21 % ab, wobei hauptsächlich C₆-NBD-FS (zu 65 %), aber nach 70 Minuten immerhin 15 % C₆-NBD-PC gebildet werden (Abb. 40 A). Dieser Anteil sinkt zum Ende der Inkubationszeit wieder auf 7 % ab. C₆-NBD-DG liegt in jeweils gleichbleibenden Anteilen von ungefähr 9 % vor.

Nach zweistündiger Inkubation von NG-Zellen mit C₆-NBD-PA ist die Ausgangssubstanz mit bis zu 27 % der gesamten Fluoreszenz noch als Hauptanteil vorhanden (Abb. 40 B). C₆-NBD-PC wird neu gebildet. Es liegt bereits mit Beginn der Inkubation im Brutschrank zu 8 %, nach 30 Minuten sogar zu 25 % und nach 2 Stunden immerhin noch zu 13 % in den Zellen vor. Gebildetes C₆-NBD-DG ist am Anfang mit einem Anteil von 33 % vorhanden, welcher nach 2 Stunden auf 18 % reduziert ist. C₆-NBD-FS ist im Überstand der einzige relevante Bestandteil mit bis zu 18 % der gesamten Fluoreszenz.

Messungen an C₆-NBD-PA markierten NFB-Zellen wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt. Analysiert man die nach dieser Inkubationszeit vorhandenen fluoreszenzmarkierten Lipide, so findet sich auch in diesen Zellen eine deutliche Metabolisierung des Lipids zu C₆-NBD-PC (Abb. 40 C). Es liegt nach 60 Minuten zu 24 % der gesamten Fluoreszenz in den Zellen vor. Der Anteil an C₆-NBD-PA reduziert sich in diesem Zeitraum in den Zellen von 32 auf 19 %. C₆-NBD-DG liegt zu Beginn zu 34 % vor, nach einer Stunde zu 13 %, wird also offensichtlich wie bei den anderen Zelllinien zunächst bei Kälte gebildet und während der Inkubation im Brutschrank zu anderen Lipiden umgebaut. Den Hauptanteil im Überstand bildet wiederum C₆-NBD-FS mit 22 % am Ende der Inkubationszeit.

Abb. 40 (Abbildung umseitig) Turnover-Untersuchung von C₆-NBD-PA nach Inkubation von unterschiedlichen Zellen. Lipide von Zellen und Überständen wurden bei NG- und NFB-Zellen unabhängig voneinander aufgetrennt.

Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler (n nach Angabe).

- A) DMSO-differenzierte HL-60 Zellen (n = 6)
- B) NG-Zellen (n = 4)
- C) NFB-Zellen (n = 4)

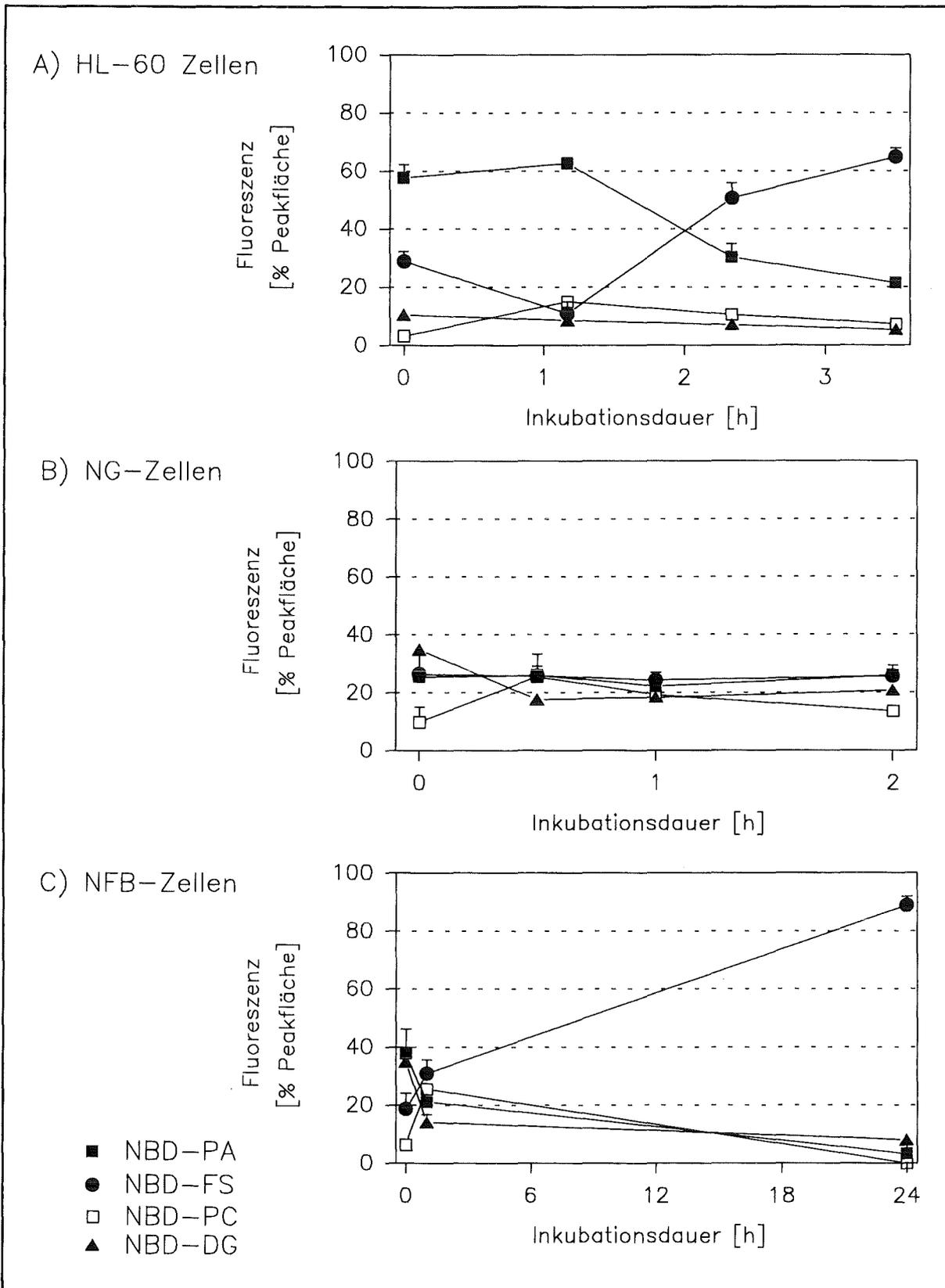


Abb. 40

3.2.4.3 Turnover von NBD-markiertem PS

NBD-markiertes PS wird im Vergleich zu C_6 -NBD-PA wesentlich schneller von HL-60 Zellen abgebaut (Abb. 41). Dabei entsteht lediglich C_6 -NBD-FS, welches im Überstand zu finden ist und am Ende der Inkubationsdauer die vorherrschende fluoreszierende Substanz darstellt. Eine Bildung von C_6 -NBD-PC ist praktisch nicht festzustellen (4 % ist am Ende der einstündigen Inkubationszeit bei 4 °C vorhanden, wird dann aber abgebaut).

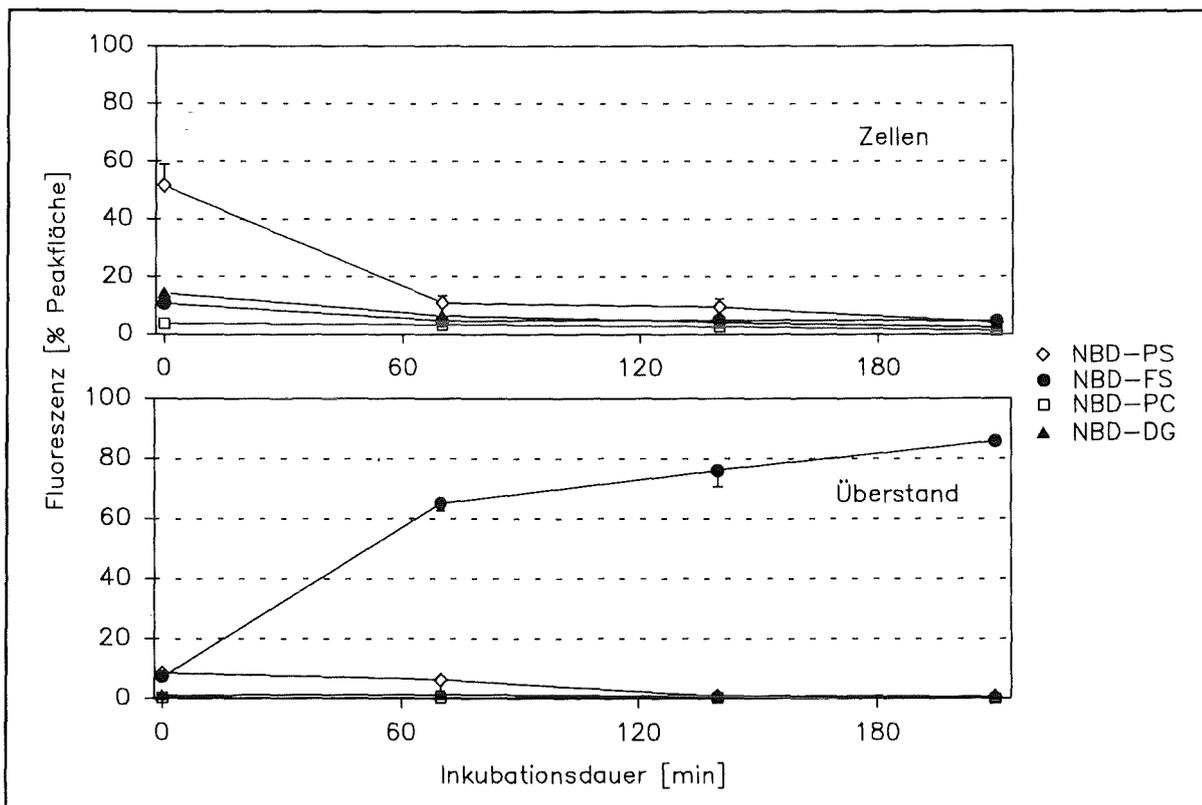


Abb. 41 Turnover-Untersuchung von C_6 -NBD-PS nach Inkubation von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen. Lipide von Zellen und Überständen wurden unabhängig voneinander aufgetrennt. Summe aller durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Aktivitäten zum jeweiligen Zeitpunkt = 100 %. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$).

3.2.5 Tabellarische Zusammenfassung der Versuche zum Turnover markierter Lipide

In ihren Grundaussagen lassen sich die Ergebnisse der Turnover-Untersuchungen in folgenden Tabellen zusammenfassen:

Zelllinie	markiertes Lipid	Umbau in	
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara	^{14}C -Ara-PE ^{14}C -Ara-PC ^{14}C -Ara-PI ^{14}C -Ara-PS ^{14}C -Ara-TG ^{14}C -Ara-PA	Abb. 33
undifferenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Pal-PC	-	n.d.
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Pal-PC	-	Abb. 34
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	Pal- ^3H -PC	-	n.d.
undifferenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PC	^{14}C -Ara-PE ^{14}C -Ara-PI	Abb. 35
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PC	^{14}C -Ara-PE ^{14}C -Ara-PI ^{14}C -Ara-PA	Abb. 36
undifferenzierte bzw. DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PE	^{14}C -Ara-PC ^{14}C -Ara-PI ^{14}C -Ara-PS ^{14}C -Ara-PA	Abb. 37
n.d. nicht dargestellt			

Tab. 2 Ergebnisse zum Turnover nach Inkubation mit radioaktiv markierten Lipiden.

Zelllinie	markiertes Lipid	Umbau zu	
DMSO- differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PC	C ₆ -NBD-FS	Abb. 38, Abb. 39
NG-Zellen	C ₆ -NBD-PC	C ₆ -NBD-FS	Abb. 38, Abb. 39
NFB-Zellen	C ₆ -NBD-PC	C ₆ -NBD-FS	Abb. 38, Abb. 39
DMSO- differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PA	C ₆ -NBD-PC, C ₆ -NBD-FS	Abb. 40
NG-Zellen	C ₆ -NBD-PA	C ₆ -NBD-PC C ₆ -NBD-DG	Abb. 40
NFB-Zellen	C ₆ -NBD-PA	C ₆ -NBD-PC C ₆ -NBD-FS	Abb. 40
DMSO- differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PS	C ₆ -NBD-FS	Abb. 41

Tab. 3 Ergebnisse zum Turnover nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Lipiden

3.3 Untersuchungen zum Ab- und Umbau von Lipiden nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Agentien

Wie zunehmend mehr Untersuchungen belegen, hat die PLA₂ im Zusammenhang mit pathologischen Erscheinungen eine besondere Bedeutung. Daraus folgt die dringende Notwendigkeit ihrer Aktivitätsbestimmung. Die Nachteile bisheriger Methoden sollen nun mit Hilfe des Ersatzes radioaktiv markierter durch fluoreszenzmarkierte Substanzen umgangen werden. Auf Grund der bisher geringen Kenntnisse über das Verhalten der eingesetzten fluoreszierenden Substrate sind die in den vorherigen Kapiteln dargestellten Untersuchungen notwendige Grundlage für die Erarbeitung einer Methode zur Aktivitätsbestimmung.

Die PLA₂ läßt sich mit Hilfe verschiedener Agentien stimulieren und damit meßbar machen. Viele davon wirken über den Einstrom von Calcium und daher unspezifisch. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde in erster Linie das Calciumionophor A23187 verwendet. Da es eine starke zytotoxische Wirkung hat, wurde es in einer Konzentration und für eine Einwirkzeit am Ende der Inkubationszeit verwendet, die nach Vorversuchen noch keine Auswirkung auf die Vitalität der Zellen zeigte. Für die NG-Zellen wird in der Literatur häufig das Bradykinin, aber auch das Melittin als Stimulanz erwähnt. Daher wurden diese beiden Substanzen zusätzlich, ebenfalls am Ende der Inkubationszeit bei den beiden festwachsenden Zelllinien der NG- und NFB-Zellen angewendet.

Wie beschrieben wirken offensichtlich auch schwermetallorganische Verbindungen stimulierend auf die PLA_2 . Um die chronische Wirkung niedriger Dosen zu untersuchen, wurde beispielhaft Triethylbleichchlorid und auch Dibutylzinndichlorid in geringen Konzentrationen und bis zu 48stündigen Einwirkzeiten eingesetzt. Dies geschah stichprobenartig bei NG- und NFB-Zellen, da diese sich am längsten im Inkubationsmedium vital zeigten. Gerade für diese Untersuchungen bot sich ausschließlich der Einsatz der neu erarbeiteten Aktivitätsbestimmung mit Hilfe fluoreszierender Substanzen an.

In diesem Abschnitt werden Versuchsergebnisse, die keine Veränderung der Ergebnisse nach Behandlung gegenüber den Kontrollansätzen ergeben, in der Regel nicht graphisch dargestellt.

3.3.1 Effekt von Calciumionophor auf den Metabolismus radioaktiv markierter Lipide in HL-60 Zellen

3.3.1.1 Behandlung ^{14}C -Pal-PC bzw. Pal- 3H -PC markierter HL-60 Zellen

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können weitgehend wie folgt zusammengefaßt werden: Undifferenzierte wie auch mit DMSO differenzierte HL-60 Zellen, welche mit ^{14}C -Pal-PC oder Pal- 3H -PC inkubiert wurden, zeigen nach Behandlung mit A23187 keine signifikant veränderte Zusammensetzung der radioaktiv markierten Lipide (z.B. Abb. 42).

Betrachtet man die Verteilung der Gesamtaktivität der durch Lipidextraktion extrahierbaren bzw. der in der wässrigen Phase verbleibenden radioaktiv markierten Substanzen, so ergeben sich durch Zugabe des Calciumionophors ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen (Abb. 43).

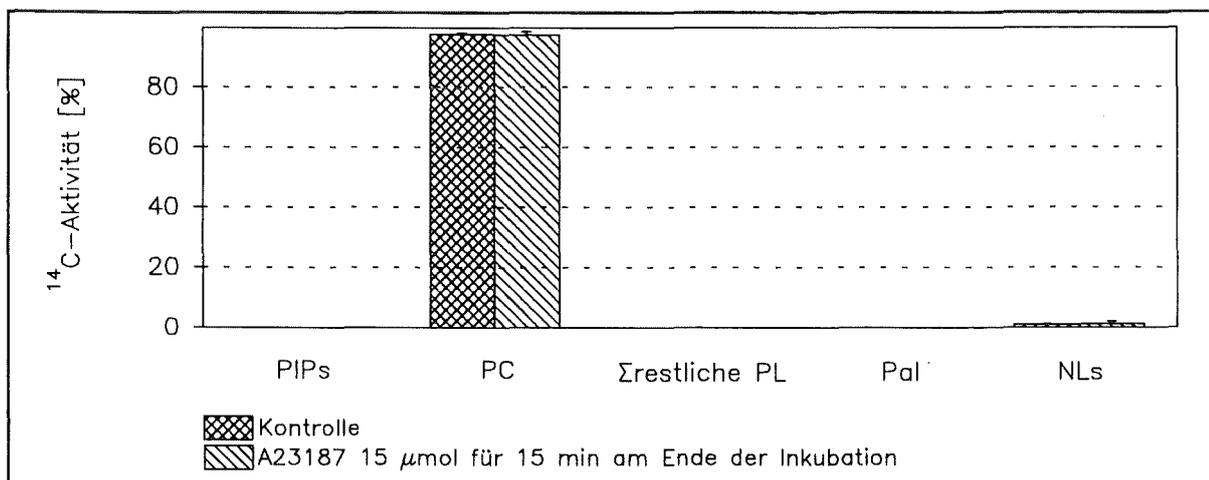


Abb. 42 Zusammensetzung der radioaktiv markierten Lipide nach 210 Minuten von ^{14}C -Pal-PC markierten DMSO-differenzierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der prozentualen Anteile.

Summe der Aktivitäten in den Lipiden = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4)

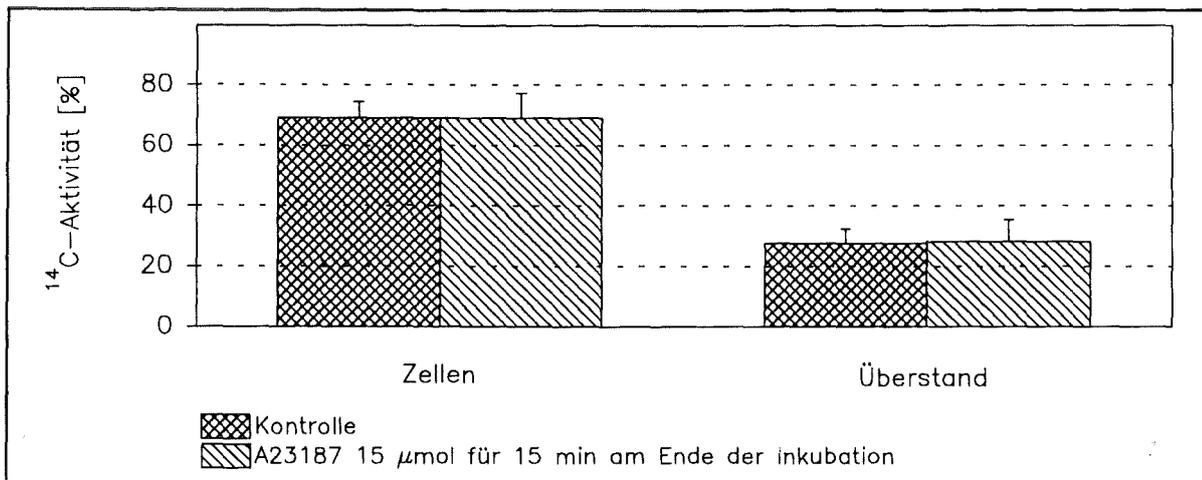


Abb. 43 Verteilung der Aktivität zwischen Zellen und Überständen nach 210 Minuten aus ^{14}C -Pal-PC markierten DMSO-differenzierten HL-60 Zellen, mit und ohne Calciumionophor Behandlung. Darstellung der prozentualen Anteile.

Summe der Aktivitäten = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3)

3.3.1.2 Behandlung ^{14}C -Ara-PC markierter HL-60 Zellen

Im Vergleich zu den bisher dargestellten Ergebnissen ergibt sich eine andere Sachlage bei Markierung mit radioaktiv markierten Lipiden, deren Fettsäure an der *sn*-2 Position Arachidonsäure ist.

Die Zugabe von Calciumionophor zu undifferenzierten, mit ^{14}C -Ara-PC markierten HL-60 Zellen führt, wie zu erwarten war, ebenfalls zu keinem statistisch signifikanten Unterschied sowohl bezüglich der Lipidzusammensetzung (Abb. 44) als auch bei Betrachtung der Verteilung der Aktivität (ohne Abbildung).

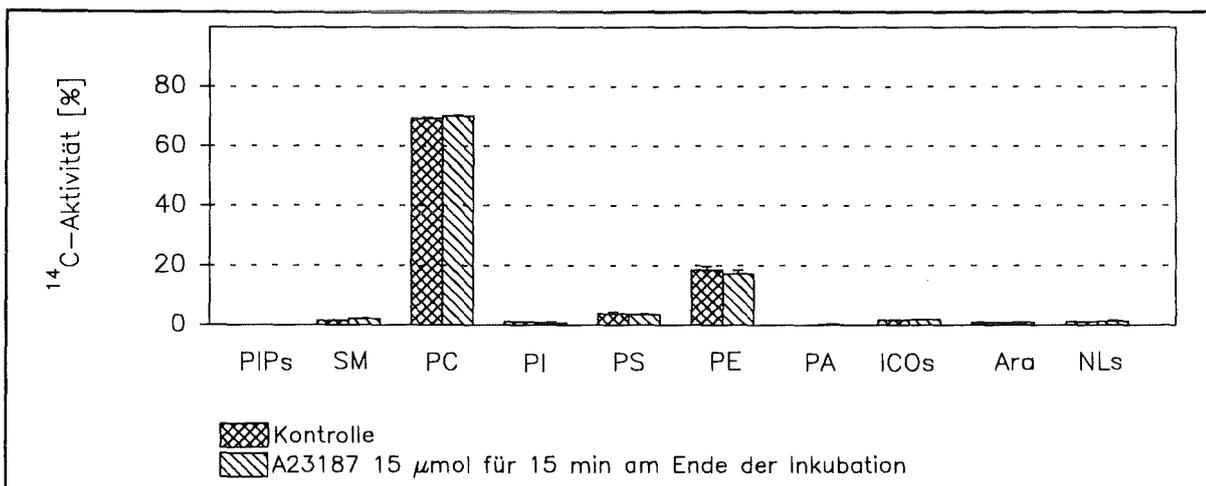


Abb. 44 Zusammensetzung der radioaktiv markierten Lipide nach 210 Minuten von ^{14}C -Ara-PC markierten undifferenzierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der prozentualen Anteile.

Summe der Aktivitäten in den Lipiden = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3)

Markiert man dagegen differenzierte HL-60 Zellen mit ^{14}C -Ara-PC, so findet man als Reaktion auf eine Behandlung mit dem Calciumionophor statistisch signifikante Veränderungen der Lipidzusammensetzung (Abb. 45). Bei Betrachtung der gesamten aus den Zellen extrahierbaren Lipide nimmt der Anteil an radioaktiv markiertem PC um 5 % ab, der Anteil an PE um 4 % zu. Der ohnehin geringe Anteil an freier Arachidonsäure bleibt hier unbeeinflusst. Die hauptsächlichen und auch statistisch signifikanten Veränderungen finden dabei in den Zellen statt. Die Verteilung der Gesamtaktivitäten ist dementsprechend auch hiervon nicht betroffen (Abb. 46).

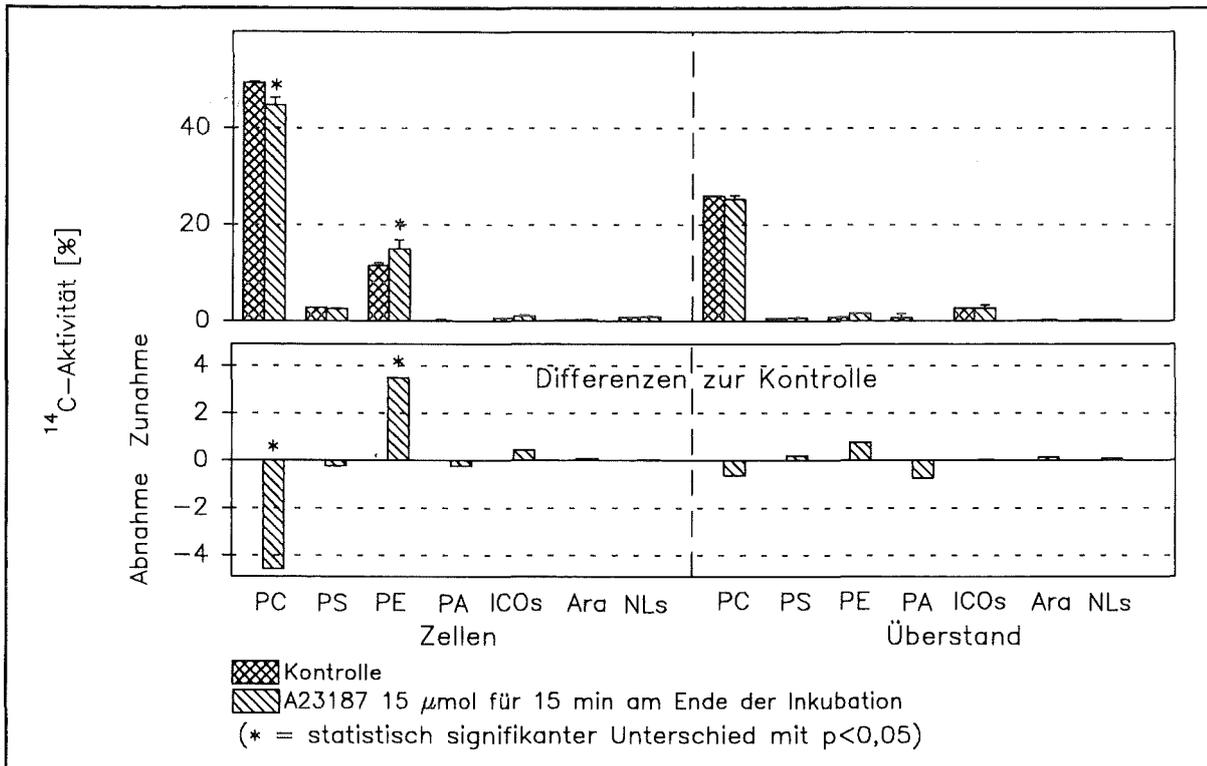


Abb. 45 Zusammensetzung der radioaktiv markierten Lipide nach 210 Minuten von ^{14}C -Ara-PC markierten DMSO-differenzierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der prozentualen Anteile.

Summe der Aktivitäten in den Lipiden = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$)

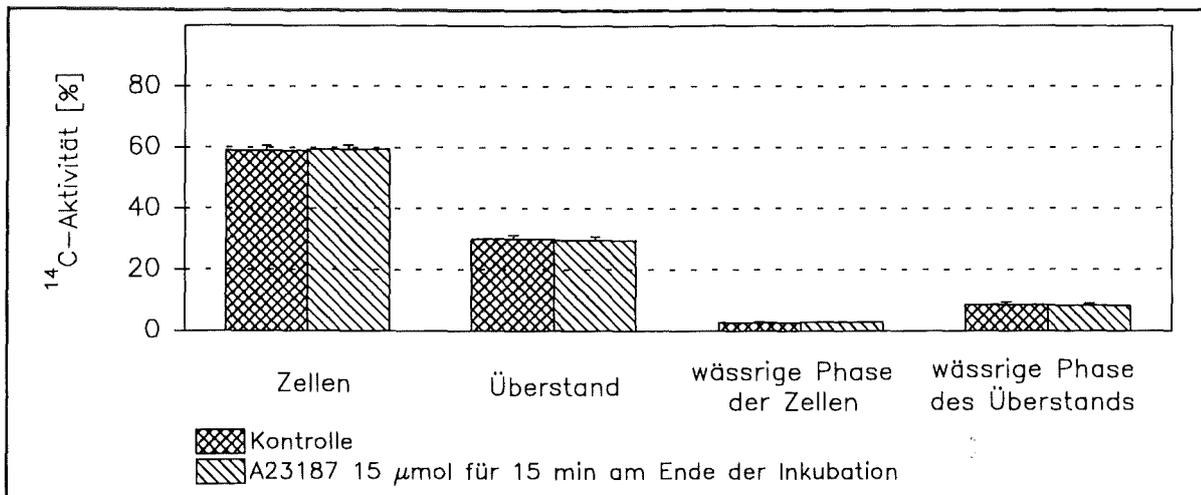


Abb. 46 Verteilung der Aktivität zwischen Zellen, Überständen und wässrigen Phasen nach 210 Minuten in ^{14}C -Ara-PC markierten DMSO-differenzierten HL-60 Zellen, mit und ohne Calciumionophor Behandlung. Darstellung der prozentualen Anteile, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Aktivitäten = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3)

3.3.1.3 Behandlung ^{14}C -Ara-PE markierter HL-60 Zellen

Zellen, die während einer 24stündigen Differenzierungszeit mit ^{14}C -Ara-PE markiert wurden, zeigen nach 15minütiger Inkubation mit A23187 eine statistisch signifikante Erniedrigung der radioaktiv markierten Lipide PS (ungefähr 1,4 %) sowie PA (ungefähr 1,2 %) (Abb. 47). Gleichzeitig steigt der Anteil an radioaktiv markierter Arachidonsäure um 3 %. Die Verteilung der Gesamtaktivität zeigt keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abb. 48).

HL-60 Zellen, die fünf Tage differenziert wurden, reagieren bei gleicher Markierung auf diese Behandlung mit einer statistisch signifikanten Verminderung des Anteils an radioaktiv markiertem PC um insgesamt 2,5 % und an radioaktiv markiertem PE um insgesamt 4,7 % (Abb. 49). Der Anteil an markiertem PA, Neutrallipiden sowie freier Arachidonsäure nimmt in den Zellen jeweils nur geringfügig, aber reproduzierbar zu. Auch bei dieser Markierung finden die hauptsächlichen und statistisch signifikanten Veränderungen in den Zellen statt, wobei allerdings der Anstieg der Arachidonsäure von 4 % im Überstand zu verzeichnen ist.

Die Betrachtung der Verteilung der Gesamtaktivitäten zeigt statistisch signifikant eine mit diesen Verschiebungen der radioaktiv markierten Lipide einhergehende Abnahme der Gesamtradioaktivität in den Zellen von 6,8 % bei gleichzeitiger Zunahme im Medium von 4,2 % (Abb. 50).

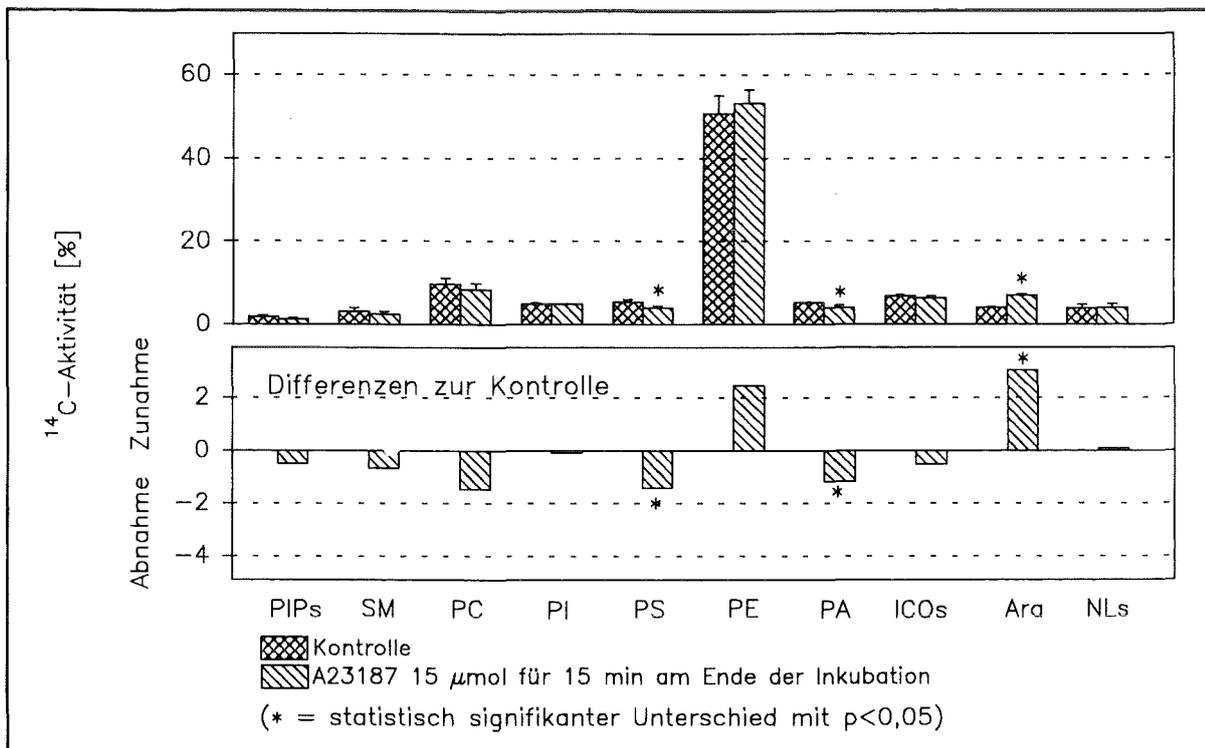


Abb. 47 Zusammensetzung der radioaktiv markierten Lipide nach einem Tag von ^{14}C -Ara-PE markierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Differenzierung und Markierung fanden gleichzeitig statt. Darstellung der prozentualen Anteile, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Aktivitäten in den Lipiden = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$)

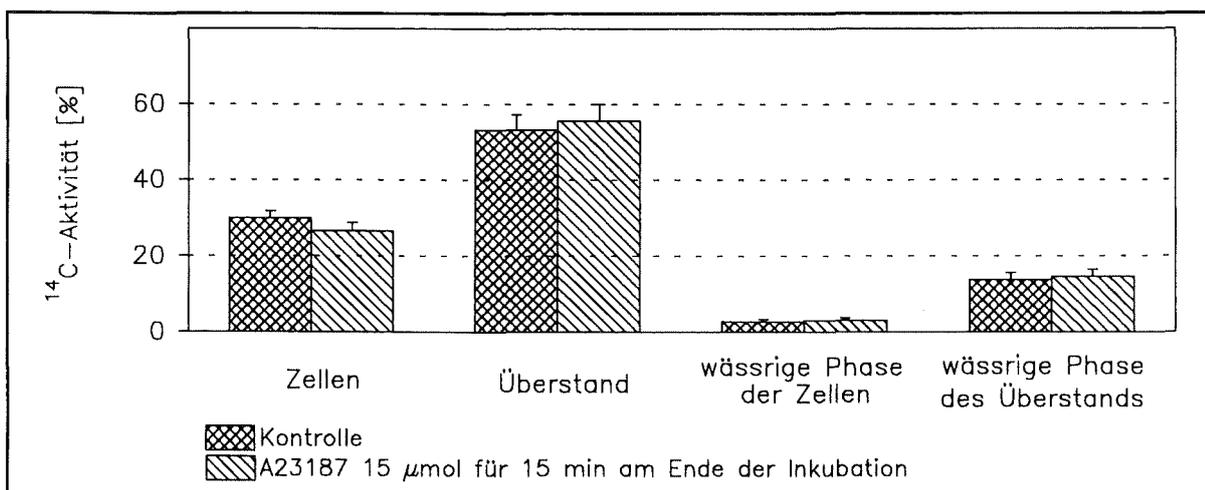


Abb. 48 Verteilung der Aktivität zwischen Zellen, Überständen und wässrigen Phasen nach einem Tag aus ^{14}C -Ara-PE markierten HL-60 Zellen, mit und ohne Calciumionophor Behandlung. Die Zellen wurden gleichzeitig differenziert und markiert. Darstellung der prozentualen Anteile.

Summe der Aktivitäten = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$)

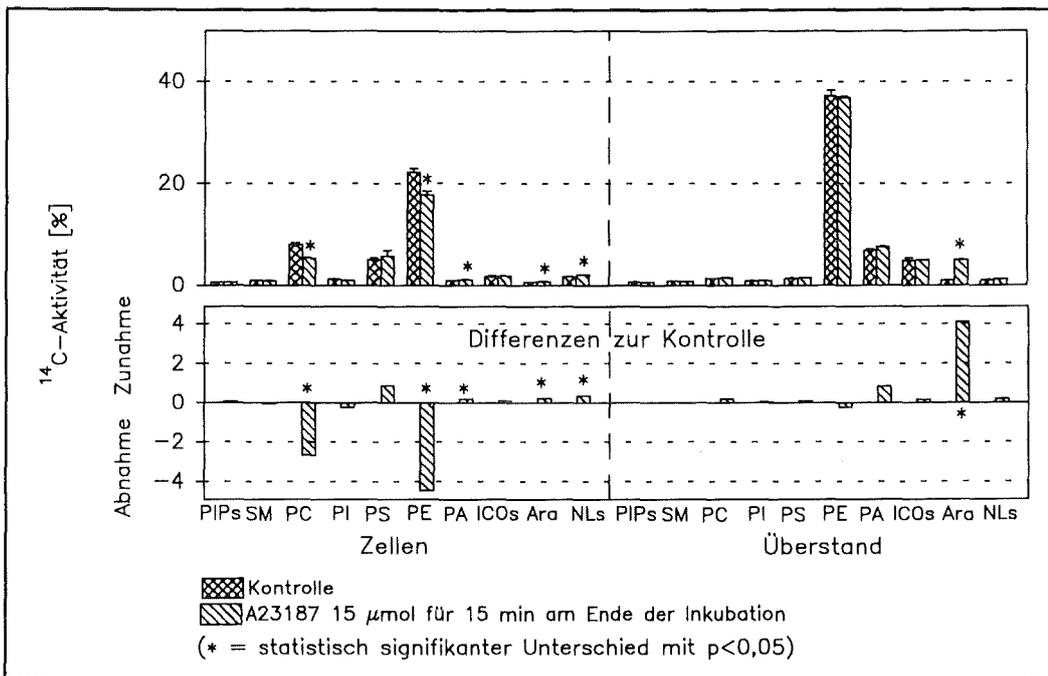


Abb. 49 Zusammensetzung der radioaktiv markierten Lipide nach fünf Tagen von ¹⁴C-Ara-PE markierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Differenzierung und Markierung fanden gleichzeitig statt. Darstellung der prozentualen Anteile, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Aktivitäten in den Lipiden = 100 %
 Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4)

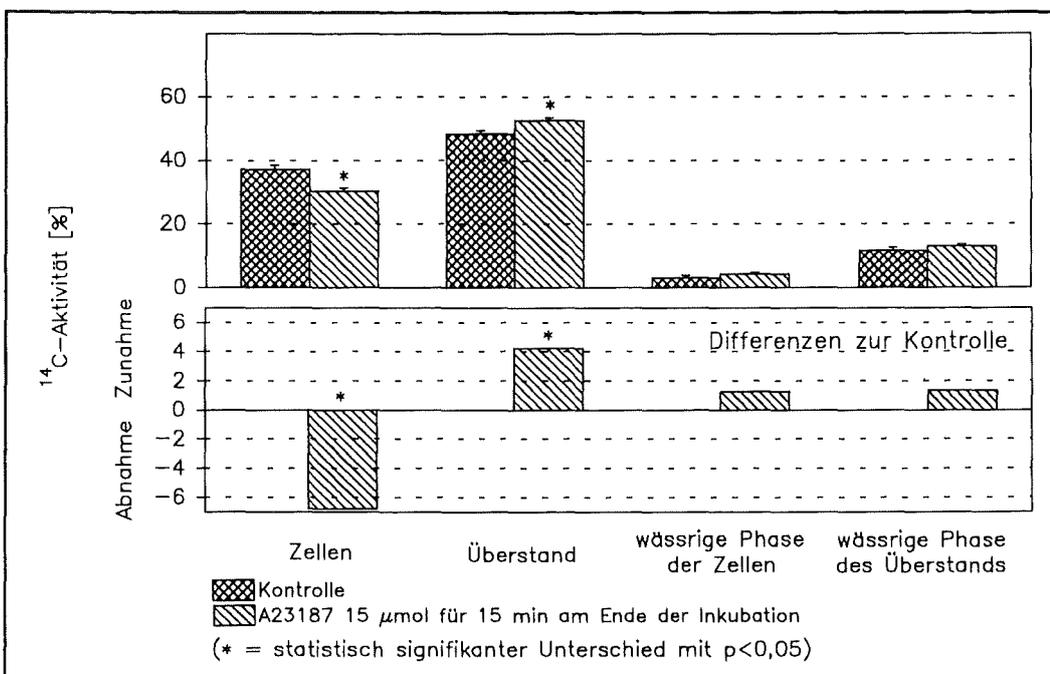


Abb. 50 Verteilung der Aktivität zwischen Zellen, Überständen und wässrigen Phasen nach fünf Tagen aus ¹⁴C-Ara-PE markierten HL-60 Zellen, mit und ohne Calciumionophor Behandlung. Die Zellen wurden gleichzeitig differenziert und markiert. Darstellung der prozentualen Anteile.

Summe der Aktivitäten = 100 %
 Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4)

3.3.2 Ergebnisse nach Einwirkung von Calciumionophor, Bradykinin oder Melittin auf fluoreszenzmarkierte Zellen

3.3.2.1 Behandlung von C_6 -NBD-PC markierten Zellen

Inkubiert man HL-60 Zellen mit dieser Art von Markierung nach 55 Minuten Vorinkubation mit A23187, so zeigen sich statistisch signifikante Veränderungen bei der Zusammensetzung der meßbaren fluoreszierenden Lipide (Abb. 51), was bei 195minütiger Vorinkubation nicht mehr festgestellt werden kann (ohne Abbildung). Erstaunlicherweise beziehen sich diese signifikanten Veränderungen nach der kurzen vorhergehenden Inkubationszeit vorwiegend auf einen höheren Gehalt an C_6 -NBD-PC in den Zellen bei gleichzeitig verringerter Molmenge an C_6 -NBD-FS und C_6 -NBD-PC im Überstand. Dies ist aber nicht auf einen Einbau der Fettsäure, sondern auf andere, später zu diskutierende Gründe zurückzuführen.

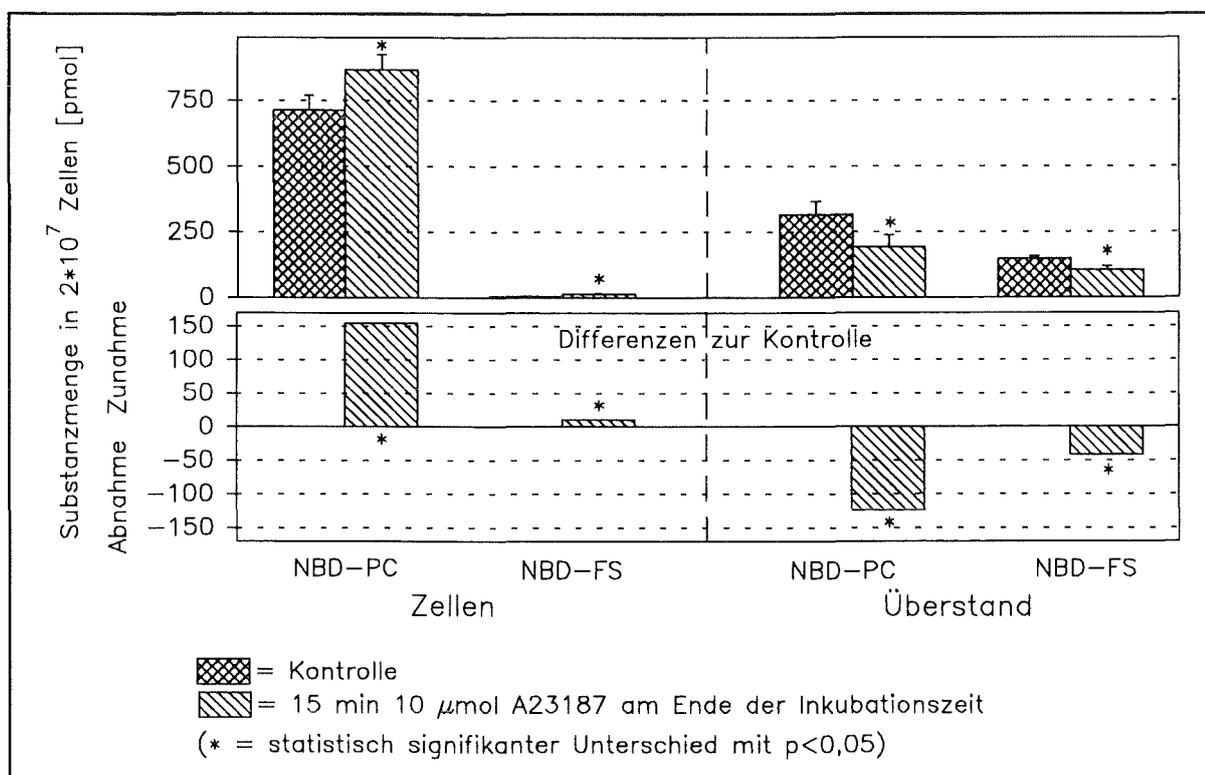


Abb. 51 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 70 Minuten von C_6 -NBD-PC markierten DMSO-differenzierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der Absolutmengen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Aktivitäten in den Lipiden = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 5)

Markiert man NG-Zellen mit C_6 -NBD-PC und inkubiert diese anschließend mit verschiedenen Agentien, so läßt sich sowohl bei 24stündiger als auch bei 48stündiger Vorinkubation keine statistisch signifikante Veränderung der Zusammensetzung der fluoreszierenden Lipide feststellen. Auch bezüglich der Verteilung der Fluoreszenz zwischen Zellen und Überständen ist kein Effekt dieser Agentien zu beobachten (beides ohne Abbildung).

NFB-Zellen zeigen je nach Inkubationsdauer nach der Markierung mit C_6 -NBD-PC unterschiedliche Reaktionen auf Behandlung mit verschiedenen Agentien. Bei 24stündiger Inkubation bewirken diese Substanzen keine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Zellen (Abb. 52). Wie man in der gleichen Abbildung sieht, bleibt die Verteilung der Fluoreszenz ebenfalls nahezu unbeeinflusst.

Anders ist dies bei einer Inkubationsdauer von 48 Stunden (Abb. 53). Nach dieser Vorinkubationszeit bewirken praktisch alle Agentien eine in vielen Versuchen statistisch signifikante Erhöhung der NBD-markierten Fettsäure im Überstand bei gleichzeitiger Abnahme des C_6 -NBD-PC in den Zellen. Da die Aufnahme der Markierungssubstanz C_6 -NBD-PC bei diesen Zellen immerhin so unterschiedlich ist, daß die Differenzen, die sich jeweils im Pikomolbereich der Substanzen bewegen, nach Zusammenfassung aller Versuche keine eindeutige Darstellung mehr zulassen, wird in diesem Fall repräsentativ ein Versuch mit 3 parallelen Ansätzen gezeigt.

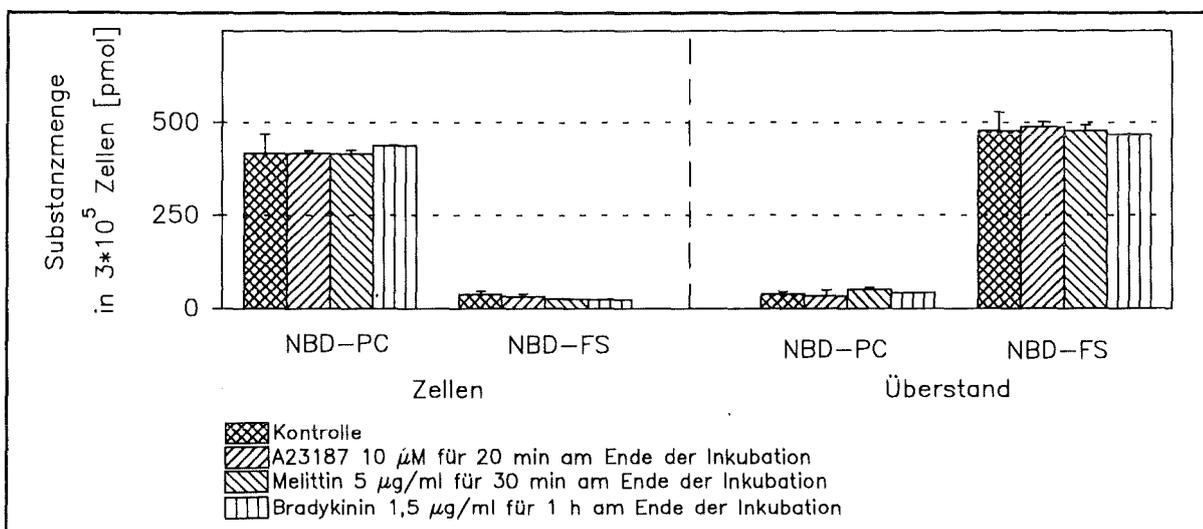


Abb. 52 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 24 Stunden von C_6 -NBD-PC markierten NFB-Kontrollzellen im Vergleich zu NFB Zellen, die mit verschiedenen Agentien behandelt wurden. Darstellung der Absolutmengen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$). Repräsentativ für 4 Versuche.

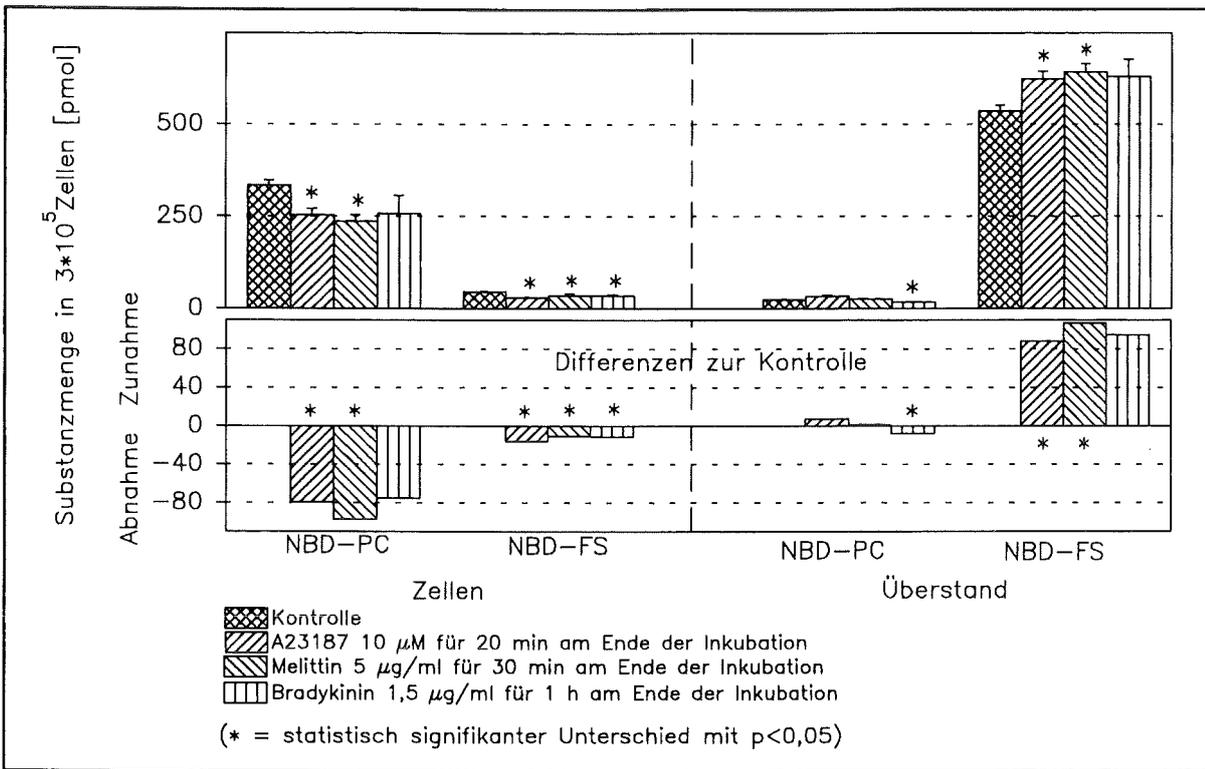


Abb. 53 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 48 Stunden von C_6 -NBD-PC markierten NFB-Kontrollzellen im Vergleich zu NFB Zellen, die mit verschiedenen Agentien behandelt wurden. Darstellung der Absolutmengen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 3$). Repräsentativ für 4 Versuche.

3.3.2.2 Behandlung von C₆-NBD-PA markierten Zellen

C₆-NBD-PA markierte HL-60 Zellen, die dieses fluoreszierende Lipid metabolisieren, reagieren auf Behandlung mit Ionophor mit einer vermehrten Bildung von C₆-NBD-FS (Abb. 54). Gleichzeitig verringert sich der Anteil von C₆-NBD-PA und statistisch signifikant der des C₆-NBD-PC. Eine Veränderung des C₆-NBD-DG wird nicht beobachtet. Dies Ergebnis ist sowohl nach 55minütiger als auch nach 125minütiger Vorinkubation festzustellen.

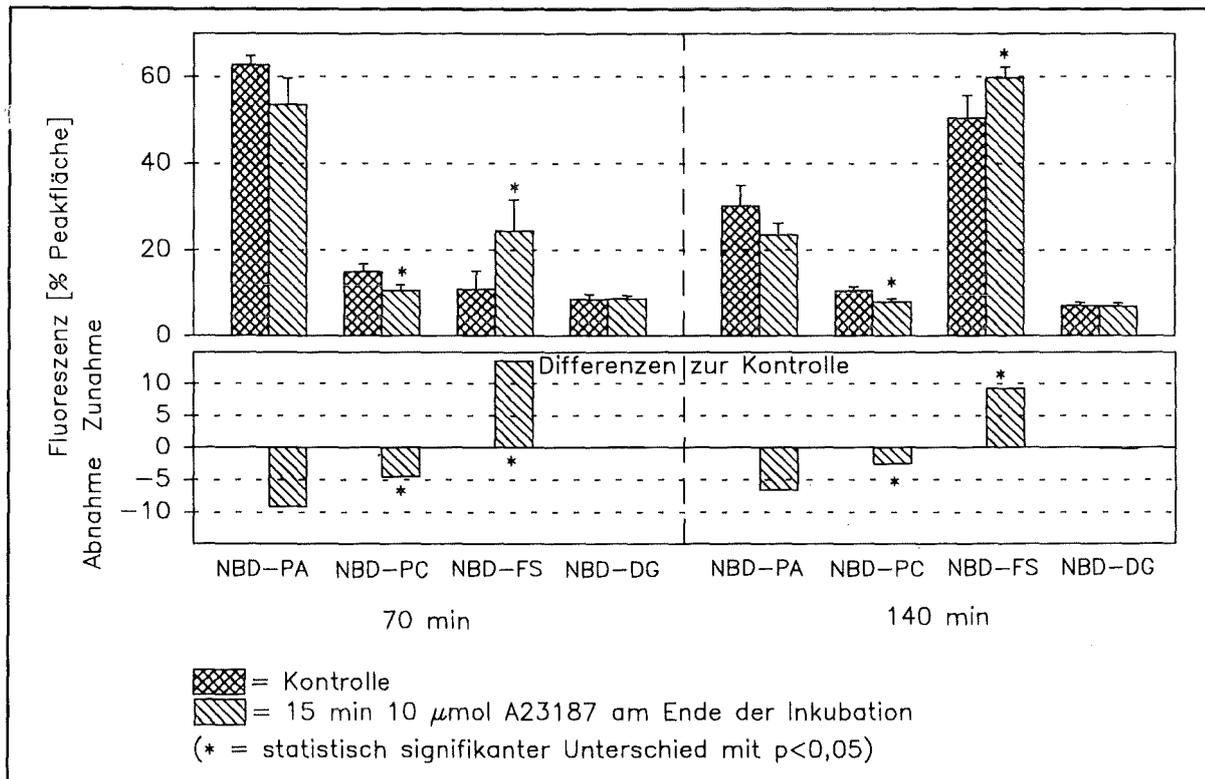


Abb. 54 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 70 und 140 Minuten von C₆-NBD-PA markierten DMSO-differenzierten HL-60-Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der prozentualen Anteile der Peakflächen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Peakflächen nach HPLC-Bestimmung = 100 %

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4)

Nachdem auch NG-Zellen das angebotene C₆-NBD-PA metabolisieren, führt eine Inkubation mit Calciumionophor zu einem statistisch signifikant erhöhtem Auftreten der fluoreszierenden Fettsäure und in geringem Umfang des C₆-NBD-PC im Überstand (Abb. 55). Gleichzeitig erniedrigt sich der Gehalt an C₆-NBD-PA, C₆-NBD-DG, C₆-NBD-PC und C₆-NBD-FS in den Zellen. Diese Verschiebungen spiegeln sich auch in einer signifikanten Erhöhung der Fluoreszenz im Überstand bei gleichzeitiger Abnahme in den Zellen wider (Abb. 56).

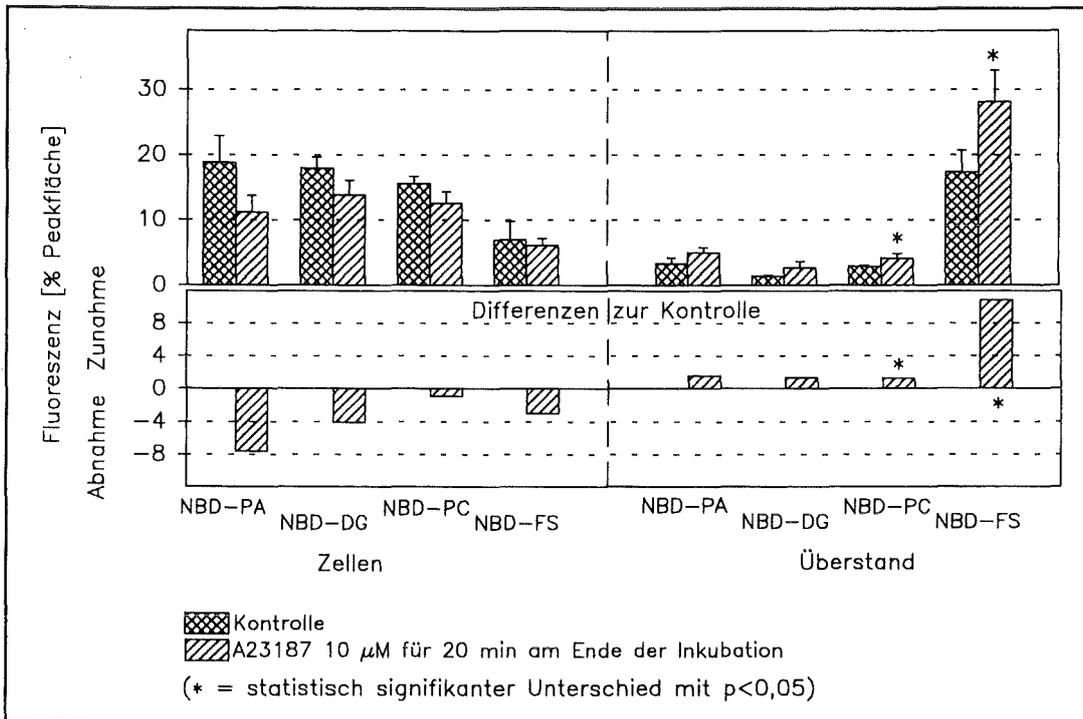


Abb. 55 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 60 Minuten von C₆-NBD-PA markierten NG-Kontrollzellen im Vergleich zu NG-Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der prozentualen Anteile der Peakflächen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Peakflächen nach HPLC-Bestimmung = 100 %
 Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4)

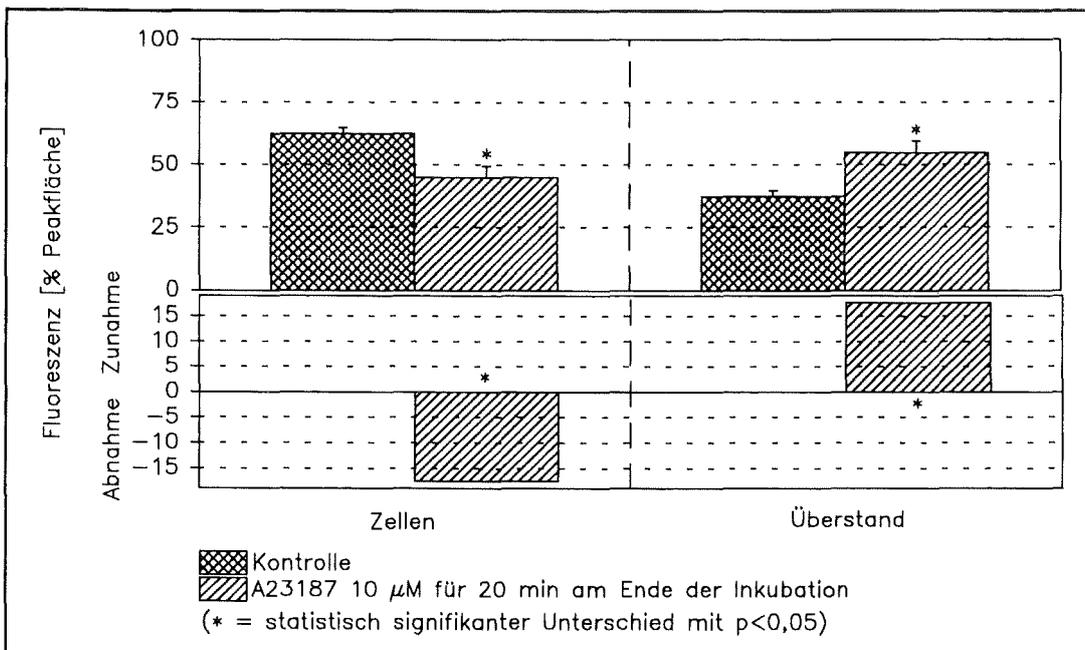


Abb. 56 Verteilung der Fluoreszenz zwischen Zellen und Überständen nach 60 Minuten in C₆-NBD-PA markierten NG-Zellen, mit und ohne Behandlung mit Calciumionophor. Darstellung der prozentualen Anteile der Peakflächen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten.

Summe der Peakflächen nach HPLC-Bestimmung = 100 %
 Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 4)

Werden NFB-Zellen mit NBD-markiertem PA inkubiert und anschließend mit verschiedenen Agentien inkubiert, so bewirkt dies nach 40minütiger Vorinkubation keine statistisch signifikante Veränderung der Zusammensetzung der fluoreszierenden Lipide, die durch Metabolisierung des C_6 -NBD-PA vorhanden sind (Abb. 57). Auch die Verteilung der Fluoreszenz zwischen Zellen bzw. Überstand bleibt dadurch unbeeinflusst (nicht dargestellt).

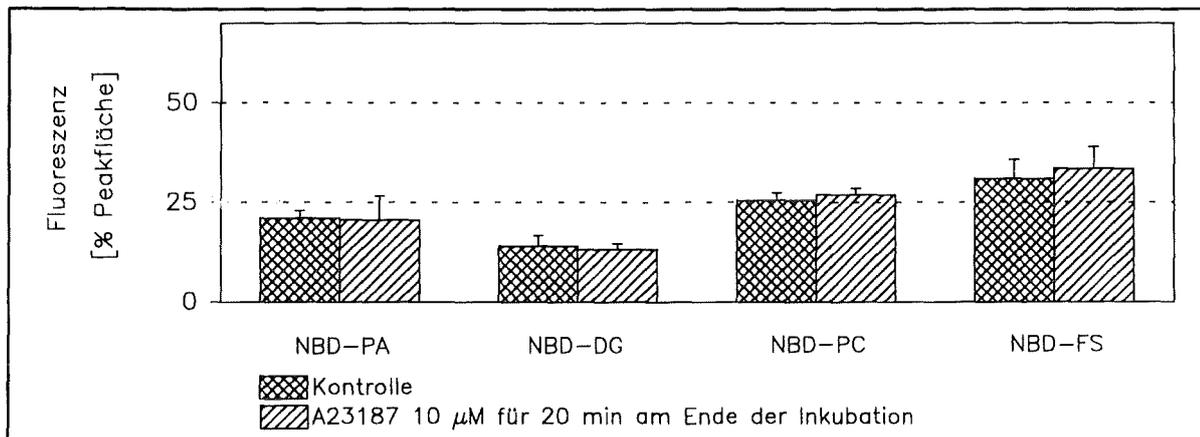


Abb. 57 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 60 Minuten von C_6 -NBD-PA markierten NFB-Kontrollzellen im Vergleich zu NFB-Zellen, die mit Calciumionophor behandelt wurden. Darstellung der prozentualen Anteile der Peakflächen. Summe der Peakflächen nach HPLC-Bestimmung = 100 %. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$)

3.3.2.3 Behandlung von C_6 -NBD-PS markierten HL-60 Zellen

HL-60 Zellen, die mit diesem fluoreszierenden Lipid inkubiert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten mit Ionophor behandelt werden, reagieren auf diesen äußeren Einfluß mit keinerlei statistisch signifikanter Veränderung ihrer fluoreszierenden Bestandteile. Die Verteilung der Fluoreszenz, die sich in den Zellen bzw. in den Überständen befindet, bleibt davon ebenfalls unbeeinflusst (beides nicht dargestellt).

3.3.3 Ergebnisse nach Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit den schwermetallorganischen Verbindungen Triethylbleichlorid und Dibutylzinnchlorid

Diese Untersuchungen wurden stichprobenartig durchgeführt, wobei hauptsächlich Triethylbleichlorid eingesetzt wurde. Da die Langzeiteinwirkung niedriger Dosen in erster Linie interessant war, wirkten geringe Konzentrationen während der gesamten Inkubationsdauer ein. Diese Einwirkzeit entspricht der Vorinkubationsdauer der im letzten Kapitel beschriebenen Versuche.

HL-60 Zellen, die mit C_6 -NBD-PC markiert wurden, zeigen als Reaktion auf eine Behandlung mit Triethylbleichlorid während 3,5 Stunden einen statistisch signifikant erhöhten Anteil von C_6 -NBD-PC in den Zellen bei gleichzeitig verringertem Anteil von C_6 -NBD-FS im Überstand (Abb. 58). Dieses Ergebnis deckt sich somit mit dem nach Behandlung mit A23187 am Ende einer 55minütigen Vorinkubation.

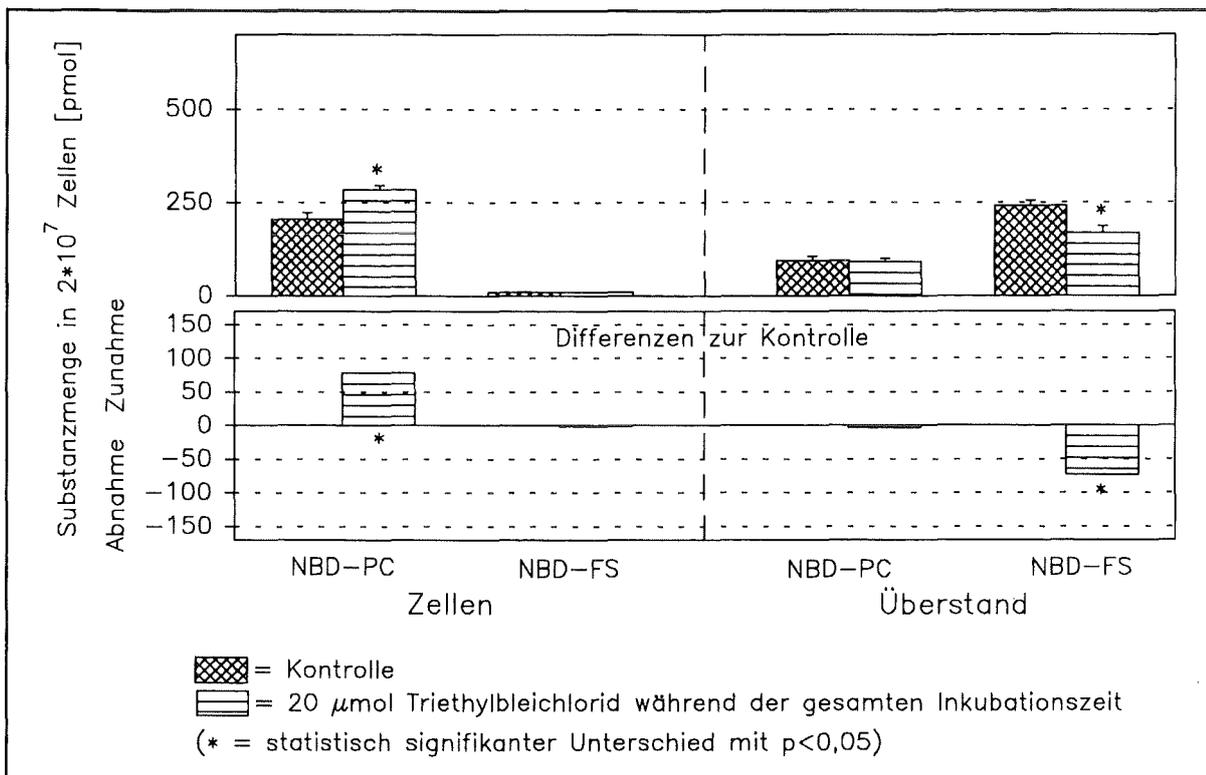


Abb. 58 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 210 Minuten von C_6 -NBD-PC markierten HL-60 Kontrollzellen im Vergleich zu HL-60 Zellen, die mit Triethylbleichlorid behandelt wurden. Darstellung der Absolutmengen, sowie der Differenzen zu den Kontrollwerten. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 5$)

C_6 -NBD-PC markierte NG-Zellen reagieren auf eine Inkubation mit Triethylbleichlorid wie auch mit Diäthylzinnchlorid bei Einwirkung während 24 und 48 Stunden mit keinerlei statistisch signifikanter Veränderung sowohl der Lipidkonstellation als auch der Verteilung der Fluoreszenz zwischen Zellen und Überstand (beides nicht dargestellt).

Behandelt man C_6 -NBD-PC markierte NFB-Zellen während 24 Stunden mit Triethylbleichlorid bzw. Diäthylzinnchlorid, so ergeben sich in der Lipidkonstellation der fluoreszenzmarkierten Lipide keinerlei signifikante Veränderungen gegenüber Kontrollzellen (Abb. 59). Ganz anders sind die Ergebnisse, wenn man die gleichen schwermetallorganischen Verbindungen für 48 Stunden auf die Zellen einwirken läßt. Hierdurch ergibt sich bei beiden Verbindungen eine Abnahme an C_6 -NBD-PC in den Zellen bei gleichzeitiger Zunahme von C_6 -NBD-FS im Überstand (Abb. 60). Auch diese Ergebnisse decken sich mit denen nach Kurzzeitbehandlung durch verschiedene Agentien.

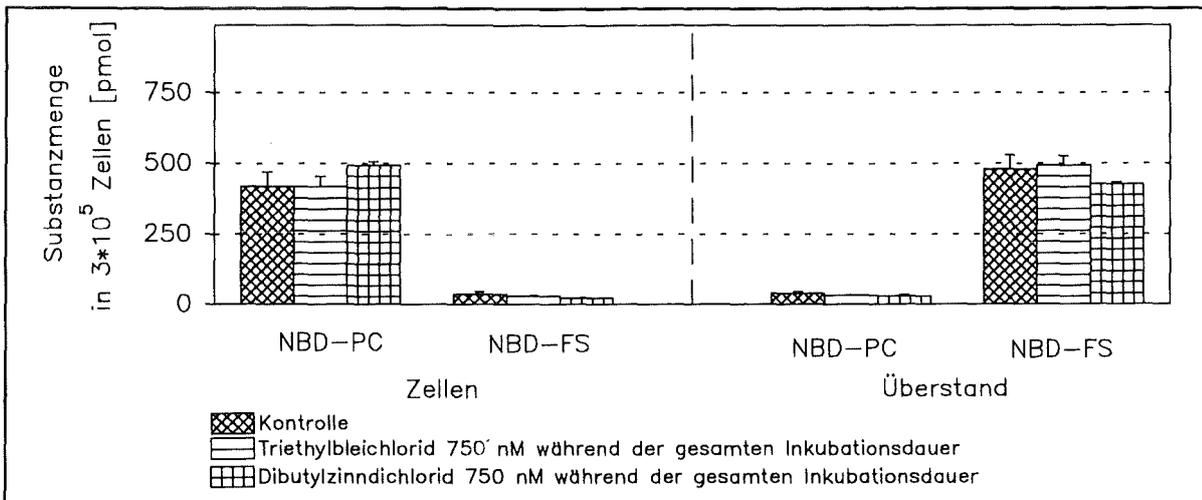


Abb. 59 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 24 Stunden von C_6 -NBD-PC markierten NFB-Kontrollzellen im Vergleich zu NFB-Zellen, die mit Triethylbleichlorid bzw. Dibutylzinnchlorid behandelt wurden. Darstellung der Absolutmengen.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3). Repräsentativ für 4 Versuche.

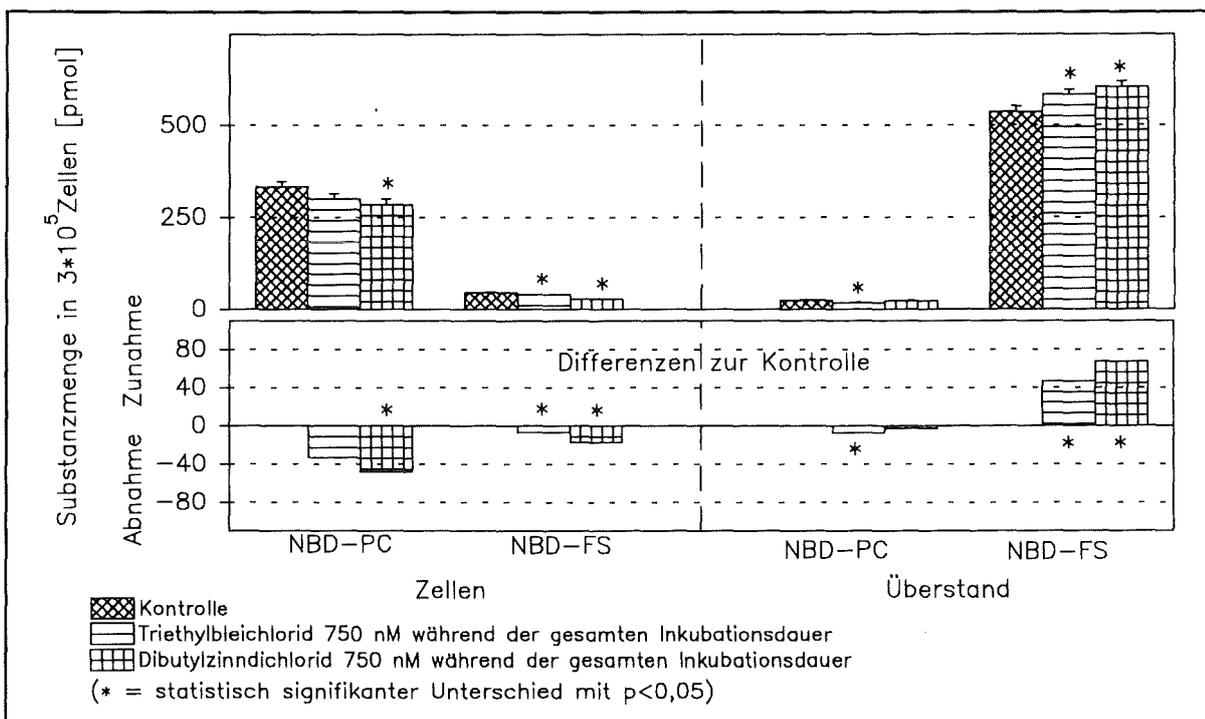


Abb. 60 Zusammensetzung der fluoreszenzmarkierten Lipide nach 48 Stunden von C_6 -NBD-PC markierten NFB-Kontrollzellen im Vergleich zu NFB-Zellen, die mit Triethylbleichlorid bzw. Dibutylzinnchlorid behandelt wurden. Darstellung der Absolutmengen.

Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (n = 3). Repräsentativ für 4 Versuche.

NFB-Zellen, die mit C_6 -NBD-PA markiert wurden, reagieren auf eine 24stündige Behandlung mit Triethylbleichlorid dagegen nicht mit einer veränderten Konstellation ihrer fluoreszenzmarkierten Lipide (nicht dargestellt). Turnover-Untersuchungen ergaben bereits, daß die Zellen nach dieser Inkubationszeit praktisch weder C_6 -NBD-PA noch C_6 -NBD-PC beinhalten.

3.3.4 Tabellarische Zusammenfassung der Versuche nach Behandlung der Zellen

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen zu Veränderungen durch Einwirkung der verschiedenen Agentien zeigen die folgenden drei Tabellen:

Zelllinie	markiertes Lipid	stat. sign. Veränderung der Lipidzusammensetzung	stat. sign. Veränderung der Radioaktivitätsverteilung zwischen Zellen und Überstand	
undifferenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Pal-PC	-	-	n.d.
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Pal-PC	-	-	Abb. 42, Abb. 43
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	Pal- ^3H -PC	-	-	n.d.
undifferenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PC	-	-	Abb. 44
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PC	^{14}C -PE \uparrow	-	Abb. 45, Abb. 46
1 Tag DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PE	^{14}C -PS \downarrow , ^{14}C -PA \downarrow , ^{14}C -Ara \uparrow	-	Abb. 47, Abb. 48
5 Tage DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	^{14}C -Ara-PE	^{14}C -PC \downarrow , ^{14}C -Ara \uparrow	Zellen \downarrow , Überstand \uparrow	Abb. 49, Abb. 50
n.d. nicht dargestellt				

Tab. 4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse radioaktiv markierter HL-60 Zellen nach Behandlung mit Calciumionophor.

Zelllinie	markiertes Lipid	stat. sign. Veränderung der Lipidzusammensetzung	stat. sign. Veränderung der relativen Gesamtfluoreszenzverteilung zwischen Zellen und Überstand	
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PC	In den Zellen: ¹⁾ C ₆ -NBD-PC↑, C ₆ -NBD-FS↑ Im Überstand: ¹⁾ C ₆ -NBD-PC↓, C ₆ -NBD-FS↓	Zellen↑, Überstand↓ ¹⁾	Abb. 51
NG-Zellen	C ₆ -NBD-PC	-	-	n.d.
NFB-Zellen	C ₆ -NBD-PC	In den Zellen ³⁾ : C ₆ -NBD-PC↓, C ₆ -NBD-FS↓ Im Überstand ³⁾ : C ₆ -NBD-FS↑	Zellen↓ ³⁾ , Überstand↑ ³⁾	Abb. 52, Abb. 53
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PA	C ₆ -NBD-PC↓, C ₆ -NBD-FS↑, C ₆ -NBD-PA↓ ²⁾	n.b.	Abb. 54
NG-Zellen	C ₆ -NBD-PA	In den Zellen: C ₆ -NBD-PA↓ ²⁾ , C ₆ -NBD-DG↓ ²⁾ , C ₆ -NBD-PC↓ ²⁾ , C ₆ -NBD-FS↓ ²⁾ im Überstand: C ₆ -NBD-PC↑, C ₆ -NBD-FS↑	Zellen↓, Überstand↑	Abb. 55, Abb. 56
NFB-Zellen	C ₆ -NBD-PA	-	-	Abb. 57
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PS	-	-	n.d.
¹⁾ dieser Effekt trat nicht immer auf ²⁾ statistisch nicht signifikant ³⁾ nur nach 48 Stunden Vorinkubation n.b. nicht bestimmt n.d. nicht dargestellt				

Tab. 5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse nach Behandlung fluoreszenzmarkierter Zellen mit Calciumionophor bei HL-60 Zellen sowie mit Calciumionophor, Bradykinin und Melittin bei NG- und NFB-Zellen.

Zelllinie	markiertes Lipid	stat. sign. Veränderung der Lipidzusammensetzung	stat. sign. Veränderung der relativen Gesamtfluoreszenzverteilung zwischen Zellen und Überstand	
DMSO-differenzierte HL-60 Zellen	C ₆ -NBD-PC	In den Zellen: C ₆ -NBD-PC↑, Im Überstand: C ₆ -NBD-FS↓	Zellen↑, Überstand↓	Abb. 58
NG-Zellen	C ₆ -NBD-PC	-	-	n.d.
NFB-Zellen	C ₆ -NBD-PC	In den Zellen ¹⁾ : C ₆ -NBD-PC↓, C ₆ -NBD-FS↓ Im Überstand ¹⁾ : C ₆ -NBD-FS↑ C ₆ -NBD-PC↓	Zellen↓ ¹⁾ , Überstand↑ ¹⁾	Abb. 59, Abb. 60
NFB-Zellen	C ₆ -NBD-PA	-	n.b.	n.d.
¹⁾ nur nach 48 Stunden Behandlung n.b. nicht bestimmt n.d. nicht dargestellt				

Tab. 6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse nach Behandlung fluoreszenzmarkierter HL-60, NG- und NFB-Zellen mit den schwermetallorganischen Verbindungen Triethylbleichlorid bzw. Dibutylzinnchlorid.

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, Ein- und Umbau fluoreszenzmarkierter Lipide in verschiedenen zellulären Systemen zu untersuchen. Auf Grund dieser Ergebnisse sollte abgeschätzt werden, inwieweit die Aktivität der membranständigen und damit stimulierbaren Phospholipase A_2 durch ein neu zu etablierendes Verfahren mit Hilfe fluoreszierender Lipide bestimmt werden kann. Dies schloß die Aufgabe ein, zunächst eine für diesen Zweck geeignete Fluoreszenzmarkierung ausfindig zu machen. Des weiteren sollten deren die Anwendung beeinflussenden Eigenschaften ermittelt werden. Um einen Vergleich mit nativen Gegebenheiten zu haben, sollte zumindest bei einer Zelllinie Einbau und Turnover extern angebotener radioaktiver Lipide untersucht werden. Auf diese Daten aufbauend war dann die Problematik der Aktivitätsbestimmung anzugehen.

Auswahl und Handhabung der Fluoreszenzmarkierung

Der Einsatz der Lipidmarkierung mit radioaktiven Isotopen zum Aufzeigen von Wirkungsmechanismen der Phospholipase A_2 hat durch das nativen Lipiden völlig gleichende Verhalten den Nachteil, daß es zu einem Wiedereinbau der zuvor freigesetzten markierten Fettsäuren kommt. Dieser Nachteil sollte durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Lipide vermieden werden. Somit waren bei der Auswahl des Substrats folgende zwei Eigenschaften wichtig: Einerseits sollte auf Grund der Fluoreszenzmarkierung die Reacylierung an Lysophospholipide sterisch behindert sein. Andererseits aber mußten die verwendeten Phospholipide, die eine solche Fettsäure an der *sn2*-Position tragen, von der Phospholipase A_2 erkannt und unter Freisetzung der fluoreszierenden Fettsäure abgebaut werden.

Es zeigte sich, daß sowohl bei HL-60 als auch bei NG- und NFB-Zellen C_6 -NBD-FS die einzige Fettsäure unter den untersuchten ist, die bei allen drei Zelllinien nicht reacyliert wird. Die von Pagano et al., 1983 verwendeten V79 Hamsterfibroblasten reagieren bezüglich C_6 -NBD-FS in ähnlicher Weise. Eine Reacylierungsfähigkeit der mit Pyren fluoreszenzmarkierten Fettsäuren konnten auch Radom et al., 1990, sowie Morand et al., 1982 nachweisen. Sowohl eigene Untersuchungen als auch die von Radom et al., 1990 zeigten zudem, daß eine Vergrößerung der Kettenlänge der fluoreszenzmarkierten Fettsäure eine Verstärkung der Aufnahme und auch des Umbaus bewirkt. Daher sind auch länger-kettige Fettsäuren für den vorliegenden Zweck nicht geeignet.

Ein für die Phospholipase A_2 geeignetes Substrat ist das Phosphatidylcholin. Daher wurde exemplarisch für alle untersuchten Lipide dieses Lipid, dessen Fettsäure an der *sn2*-Position mit C_6 -NBD markiert war, auf seine Abbaufähigkeit durch extern zugegebene Phospholipase A_2 überprüft. Es zeigte sich, daß das Lipid abgebaut werden kann, es dazu aber einer relativ großen Aktivitätsmenge bedarf. Moreau et al., 1989 berechnen eine 400 bis 600fach höhere Hydrolyserate natürlicher Lipide gegenüber der des C_6 -NBD-PC. Wie allerdings die Messung der Standardsubstanzen C_6 -NBD-PC und C_6 -NBD-FS mit Hilfe der HPLC zeigen, sind Bestimmungen bis in den pMol-Bereich möglich. Diese hohe Nachweisempfindlichkeit ist für einen Ausgleich der geringeren Hydrolyserate in der Praxis ausreichend. Auf Grund dieser Untersuchungen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Schwerpunkt auf den Fluoreszenzfarbstoff NBD gelegt, der die C_6 -Kette der Fettsäure an der *sn2*-Position markiert.

Bei den Untersuchungen fluoreszenzmarkierter Lipide stellte sich heraus, daß, bedingt durch die Markierung, für die Handhabung einige Besonderheiten zu beachten sind:

Lösungsversuche in verschiedenen Lösungsmitteln ergaben, daß bei den mit C₆-NBD markierten Substanzen die Fluoreszenzintensität stark von der Substanz und dem Lösungsmittel abhängt. So zeigt C₆-NBD-FS bei gleicher eingesetzter Konzentration in dem für die HPLC verwendeten Gemisch aus Methanol/Wasser eine um den Faktor 1,4 bis 1,8 höhere Fluoreszenzintensität als C₆-NBD-PC, was in guter Übereinstimmung mit den Daten von Wittenauer et al., 1984 und auch Moreau, 1989 ist. Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen ergaben, daß Wasser besonders stark quencht. Dagegen ist die Fluoreszenz der markierten Substanzen in Chloroform gegenüber allen anderen Lösungsmitteln am höchsten. Dafür ist dieses Lösungsmittel wegen seiner Lösungsfähigkeit, die zum Teil auch Labormaterialien betrifft, und nicht zuletzt aus Gründen der Umweltverträglichkeit und der Arbeitssicherheit, ungeeignet. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde Methanol bevorzugt für Bestimmungen C₆-NBD-markierter Substanzen verwendet.

Wie die Untersuchungen zeigten, werden C₆-NBD-markierte Lipide durch Zusätze zum Zellkulturmedium, speziell fötalem Kälberserum bzw. dessen Ersatzstoffen abgebaut. Im Falle des fötalen Kälberserums muß die C₆-NBD-FS-abspaltende Gruppe ein temperaturlabiler Faktor sein, da ein Autoklavieren des Mediums die Wirkung aufhebt. Da auch die wohldefinierten Serumersatzstoffe die Abbaufähigkeit besitzen, muß es sich nicht einmal um Lipasen oder Esterasen handeln. Im Falle des NBD mag der hydrophile Charakter dieses Fluorophors zum Tragen kommen, der die Exposition einer damit markierten Fettsäure Richtung wässrigem und damit enzymhaltigem Medium ermöglicht. Nach Wolf et al., 1992 ordnet sich das C₆-NBD-PC jedenfalls so an, daß die fluoreszenzmarkierte Fettsäure neben der hydrophilen Kopfgruppe liegt. Bei der Anordnung in Zellmembranen dürften sterische Gründe zudem eine entscheidende Rolle spielen.

Die Fluoreszenzmarkierung an sich wird bereits ohne zellulären Einfluß und bei Dunkelheit durch FKS-freies Medium abgebaut. Yedgar et al., 1987 unterdrückt die Fluoreszenzabnahme durch Zugabe eines β -Oxidationshemmers, was auf Oxidationsprozesse schließen läßt. Da eigene Untersuchungen zeigen, daß der Abbau zellabhängig begünstigt, d.h. zudem durch Enzyme bewirkt wird, müssen mehrere Faktoren eine Rolle spielen. Eine Abnahme der Fluoreszenz ist nicht von der Markierung abhängig, da sich das gleiche Phänomen auch bei der Markierung mit Pyren findet (Radom et al., 1982).

Auf Grund dieser Ergebnisse ist bei der Verwendung fluoreszenzmarkierter Lipide in jedem Fall der Einfluß des Mediums sowie der Zellen gesondert zu betrachten.

In der Literatur beschriebene Turnoveruntersuchungen zeigen, daß die Translokation von extern zugegebenem Phosphatidylcholin an die andere Seite der Membrandoppelschicht zum Teil recht zögerlich vorangeht (s.u.). Daher lag der Schritt nahe, den Ein- und Umbau weiterer C₆-NBD-markierter Phospholipide sowie deren Beeinflussung durch eine stimulierte Phospholipase A₂ zu untersuchen. Diese Lipide sind jedoch nicht kommerziell erhältlich. Sie wurden daher selbst hergestellt und gereinigt. Die Verifizierung der Lipide erfolgte mit Hilfe der folgenden Analyseschritte: Die R_F-Werte der dünnschichtchromatographischen Messungen stimmen mit denjenigen aus der Literatur von Pagano und Longmuir, 1983 überein. Auch mittels HPLC sind alle zu verifizierenden Lipide mit eindeutigem Peak je Lipid auftrennbar. Der eigentliche Beweis, der mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen geführt werden sollte, erbrachte nur qualitative Ergebnisse, da bereits die Ausgangssubstanz nicht hinreichend rein für NMR-Bestimmungen war, Reinigungsschritte aber auf Grund der geringen Mengen einen nicht praktika-

blen Weg darstellten. Alle drei Punkte zusammenfassend belegen, daß tatsächlich die geplanten Lipide synthetisiert wurden.

Zur Trennung dieser Substanzen waren verschiedene Methoden möglich. Eine Unterscheidung und damit Bestimmung durch unterschiedliche Anregungs- bzw. Emissionsmaxima schied aus, da die Spektren völlig identisch sind. Dieses Ergebnis verwundert insofern nicht, als der Grundaufbau der Lipide bei identischer Markierung immer gleich und die unterschiedliche Kopfgruppe zu weit vom C₆-NBD-Rest entfernt ist, um eine Verschiebung der Absorptionsbanden zu bewirken. Damit waren zur Auftrennung der verwendeten fluoreszenzmarkierten Lipide vorwiegend chromatographische Methoden anwendbar. Die benötigte sehr genaue Bestimmung kleinster Mengen erforderte allerdings Trennung und Quantifizierung mit Hilfe der HPLC.

Aufnahme der Lipide durch Zellen

Für die mikroskopische Untersuchung zur Aufnahme und Turnover der Substanzen war zunächst die Struktur der Lipide zu kontrollieren, in welcher sie den Zellen angeboten werden. Grundsätzlich können sich lamellare und vesikuläre Strukturen ausbilden. Lamellare Strukturen entsprechen Doppelmembranstücken, vesikuläre sind dagegen kreisförmig angeordnete Membranen. Welche Art sich ausbildet, hängt von dem Lipid ab. Die nativen Lipide Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und Phosphatidsäure bilden nach Cullis und Hope, 1985, sowie Yin et al., 1991, lamellare Strukturen. Phosphatidylethanolamin bildet hingegen vesikuläre Strukturen, wobei die Fettsäureenden nach außen ragen. Um diese in der Literatur beschriebenen Strukturen dürfte es sich bei den verwendeten radioaktiv markierten Lipiden der vorliegenden Arbeit ebenfalls handeln. Sie wurde experimentell im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt. Eine Übertragbarkeit der Literaturdaten auf fluoreszenzmarkierte Lipide war wegen der durch die Markierung völlig anderen Struktur nicht zu erwarten. Die Ergebnisse der Laserscan- und Elektronenmikroskopie zeigen jedoch die gleiche Anordnung dieser Lipide wie die der nativen, wobei die Anordnung der Fettsäureenden nicht ersichtlich ist.

Als Aufnahmemechanismus können nach Pagano et al., 1981 a mehrere Möglichkeiten diskutiert werden:

1. Lipidaustausch zwischen Lamelle und Plasmamembran.
2. Fusion der Lamelle mit der Plasmamembran.
3. Endozytose der lamellaren Struktur
4. Stabile Adsorption

Diese Möglichkeiten sind in der folgenden Abb. 61 bildlich dargestellt:

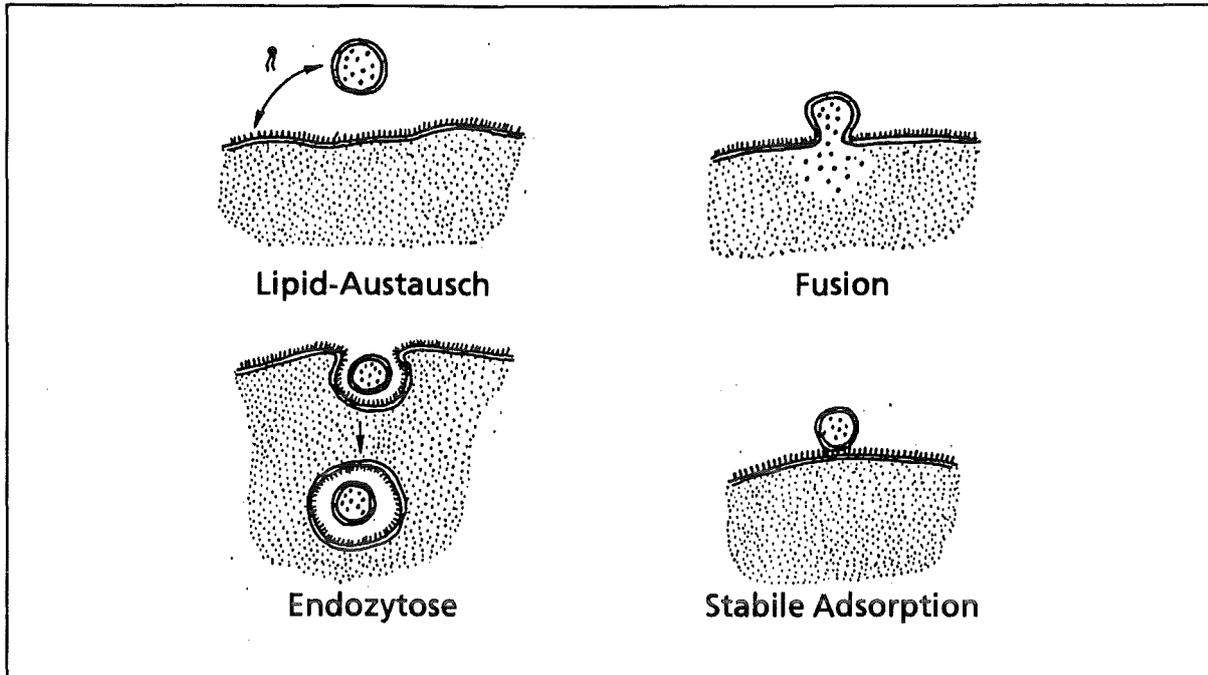


Abb. 61 Darstellung der möglichen Aufnahmemechanismen von Lipiden an Membranen (nach Pagano et al., 1981 a).

Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen bei allen drei untersuchten Zellarten keinen Unterschied zwischen Kontroll- und mit Vesikeln inkubierten Zellen. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß es zu keiner Endozytose kommt, denn in diesem Fall müßten Bündel von Membranen innerhalb vesikulärer Strukturen zu sehen sein. Eine stabile Adsorption der aufzunehmenden Vesikel ist insofern ausgeschlossen, als, zumindest im Fall der fluoreszenzmarkierten Lipide eine Aufnahme stattfindet, die fluoreszenz- und laserscanmikroskopisch nachweisbar ist. Zwischen Lipidaustausch und Fusion läßt sich allerdings durch diese Methodik nicht unterscheiden. In beiden Fällen ist die Fluoreszenzmarkierung aber, wie in der Zeichnung angedeutet, zunächst an der Außenseite der Plasmamembran und nach der Endozytose an den Innenseiten der endozytotischen Vesikel bzw. Zellorganellen angeordnet, also nie auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite zu finden. Da angenommen werden kann, daß die zelluläre Phospholipase A_2 nur dort vorhanden ist, so folgt, daß die Lipide vor ihr geschützt sind und nicht abgebaut werden können. Lediglich eine Translokation zur anderen Seite der Membrandoppelschicht kann einen Abbau ermöglichen.

Wie fluoreszenz- und laserscanmikroskopische Untersuchungen eindeutig belegen, werden C_6 -NBD-PC, C_6 -NBD-PA und C_6 -NBD-PS sehr gut von HL-60 Zellen aufgenommen ebenso C_6 -NBD-PC und C_6 -NBD-PA von NG- und NFB-Zellen. Die laserscanmikroskopischen Bilder haben hierbei die größere Aussagekraft, da durch diese Untersuchungsmethode auch in die Zelle "hineingeschaut" werden kann. Damit kann ausgeschlossen werden, daß lediglich die Plasmamembran gefärbt ist, es also nur zu einer Adsorption an der Zellmembran kommt.

Wie auch Nichols und Pagano, 1981 beobachteten, werden radioaktiv markierte Lipide gegenüber fluoreszenzmarkierten innerhalb einer Stunde in deutlich geringerer Menge aufgenommen. Aus physio-

logischer Sicht ist dies erklärbar, da regulatorisch relevante Substanzen wie Lipide bei größerer Aufnahme mit anschließendem Einbau einen bedeutenden Einfluß auf Regelmechanismen hätten. Eine verminderte Translokation zugegebener Lipide gegenüber von der Zelle synthetisierten konnte Vance, 1991 bei seinen Untersuchungen zur Aufnahme von Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin tatsächlich nachweisen. Anders scheint dies bei fluoreszenzmarkierten Lipiden zu sein. Sie haben offensichtlich so geringe Ähnlichkeit mit nativen Lipiden, daß ein Einfluß auf regulatorische Mechanismen in der Zelle nicht möglich ist. Damit hätte die größere Aufnahme keinen weiteren Folgen.

Die um einiges umfangreichere Aufnahme dieser Lipide läßt allerdings nach Pagano et al., 1981 b oder Nichols und Pagano, 1982 noch auf kein erhöhtes Vermögen zum Flip-Flop schließen. Erst ein Umbau zeigt die Akzeptanz der Zelle gegenüber einem neu aufgenommenen Stoff, d.h. macht einen Einfluß auf den Stoffwechsel möglich.

Untersuchungen von Zellen, die mit radioaktiv markierten Lipiden inkubiert wurden

Um in einem Fall den Vergleich zur Inkubation mit nativen Lipiden zu erhalten, wurden HL-60 Zellen mit radioaktiv markierten Lipiden inkubiert und Turnover-Bestimmungen durchgeführt.

Radioaktiv markierte Vorläufersubstanzen wie die Arachidonsäure werden ohne weiteres aufgenommen und markieren die Zellen, wie auch Cooke et al., 1991, sowie Morand et al., 1982 zeigen konnten, entsprechend ihrer endogenen Konzentration. Da auf Grund verschiedenster Einflüsse freigesetzte Fettsäuren, seien sie unmarkiert oder radioaktiv markiert, wieder eingebaut werden, kann auf diese Weise ein Turnover vorgetäuscht werden.

Nach Sandra und Pagano, 1979 werden ^3H -Dioleoyl-Phosphatidylcholin und ^3H -Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin ähnlich wie fluoreszenzmarkierte Lipide durch Lipidtransferprozesse, die zwischen der äußeren Membran der Vesikel und der äußeren Seite der Plasmamembran ablaufen, übertragen. Huang und Pagano, 1975 konnten ebenfalls nach Inkubation von V79 Fibroblasten mit Vesikeln aus Di- ^3H -Oleyllecithin und Dimyristoyllecithin bzw. Dioleoylphosphatidyl- ^{14}C -Cholin hauptsächlich eine Markierung der Plasmamembran, aber nach Inkubation bei 37 °C auch des Zytoplasmas feststellen. Turnover und damit eine Veränderung der Phospholipidkonstellation war allerdings nicht festzustellen. Wie die eigenen Untersuchungen zeigen, wird auch radioaktiv markiertes Phosphatidylcholin, das Palmitinsäure als Fettsäure gebunden hat, von den Zellen nicht umgebaut. Ein Einfluß des Markierungsorts wurde hierbei durch unterschiedliche Markierungen ausgeschlossen. Auch der Differenzierungsgrad erwies sich als nicht relevant.

Dagegen ergab sich erstaunlicherweise, daß Lipide, die Arachidonsäure an der *sn2*-Position tragen, umgesetzt werden. Zwei Phänomene, die einen Turnover vortäuschen könnten, ließen sich im Vorfeld ausschließen: Die Abbauuntersuchungen der Lipide in dem jeweiligen Inkubationsmedium zeigen, daß die Freisetzung an radioaktiv markierter Fettsäure durch die Medienbestandteile, also der Anteil, der wieder eingebaut werden könnte, zu gering für den gemessenen Umbau ist. Eine Freisetzung von Fettsäuren durch membranständige Enzyme kann aber auch nicht stattfinden und damit einen Turnover vortäuschen. In diesem Fall müßte mindestens dieser Anteil an freien Fettsäuren nach Inkubation mit ^{14}C - oder ^3H -markiertem Pal-PC in die verschiedenen Lipide eingebaut werden, was nicht zu beobach-

ten ist. Es gibt auch keine Hinweise darauf, daß diese Enzyme spezifisch nur Lipide mit bestimmten Fettsäuren erfassen.

Zudem unterscheidet sich die Lipidkonstellation nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C -Arachidonsäure-versehene Lipiden von der nach Inkubation mit reiner ^{14}C -Arachidonsäure. Gibt man zum Beispiel radioaktiv markiertes Phosphatidylethanolamin zu den Zellen, so findet sich Phosphatidsäure in größerem Umfang, während Phosphatidylcholin wesentlich weniger vertreten ist. Es muß sich hier um unterschiedliche Gleichgewichte handeln, die durch Inkubation mit verschiedenen Stoffen zustande kommen. Die eigentliche Substanz muß somit tatsächlich das Lipid sein und nicht die Fettsäure, die erst hieraus durch Deacylierung freigesetzt wird.

Unterschiede zwischen den Umbauergebnissen nach Inkubation mit den verschiedenen Fettsäuren zeigen, daß die gebundenen Fettsäuren für das unterschiedliche Umbauverhalten ausschlaggebend sind. Dabei nimmt die Arachidonsäure eine besondere Stellung ein. Gerade wegen deren hervorragender Rolle bei regulatorischen Prozessen ist dies besonders interessant, da so die Möglichkeit einer Beeinflussung dieser Vorgänge durch extern zugegebene, derart markierte Lipide besteht.

Bei Inkubation mit unspezifischen Stimulantien, wie z.B. dem Calciumionophor, muß bei jeglicher signifikanter Veränderung das beteiligte Enzym festgestellt werden. Bei der im Zusammenhang mit dieser Arbeit interessierenden Phospholipase A_2 ist auf Grund ihrer Spezifität an der Schnittstelle bei einer Aktivität die Freisetzung der Fettsäure der *sn*2-Position zu erwarten. Eine tatsächliche nachgewiesene Freisetzung ist dementsprechend ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung dieses Enzyms.

Nach Suga et al., 1990 und Bonser et al., 1981 kann es nach Stimulierung zellulärer Enzyme undifferenzierter HL-60 Zellen nicht zu einer Veränderung der Lipidzusammensetzung bzw. der Freisetzung einer Fettsäure kommen, da in diesen Zellen die hierfür notwendigen Enzyme entweder noch nicht ausgebildet oder nicht aktiv sind. Daher ist es auch verständlich, daß bei den eigenen Untersuchungen zum Beispiel kein Einfluß des unspezifisch wirkenden Stimulanz A23187 auf die Lipidzusammensetzung undifferenzierter HL-60 Zellen festzustellen ist.

Mit der Differenzierung ändert sich neben der Enzymzusammensetzung der Zelle auch ihre Lipidkonstellation (Naito et al., 1987). Dies macht eine Übertragbarkeit der Daten von undifferenzierten zu DMSO-differenzierten Zellen schwierig.

Betrachtet man zunächst den Einfluß von Calciumionophor auf differenzierte Zellen, die mit solchen Phosphatidylcholinen inkubiert wurden, welche Palmitinsäure an der *sn*2-Position tragen, so zeigen die vorliegenden Resultate, daß es zu keinerlei Veränderung des Markierungsmusters kommt. Nach Voelker, 1990 wird Phosphatidylcholin nach Aufnahme an der Plasmamembranaußenseite jeweils so transportiert, daß es immer nur an Stellen gelangt, die auf der dem Zytoplasma abgewandten Seite der Membranen liegen. Geht man davon aus, daß die durch das Ionophor aktivierbaren Enzyme, wie zum Beispiel die Phospholipase A_2 , im Zytoplasma bzw. der diesem zugewandten Seite aktiv sind, so können die Enzyme gar nicht an die radioaktiv markierten Substrate gelangen, also auch keine Wirkung ausüben. Dies würde erklären, weshalb tatsächlich keinerlei Abbau stattfindet. Wie Untersuchungen von Dennis et al., 1989 zeigen, kann eine Verhinderung des Abbaus auf Grund der angebotenen Verbindung jedenfalls nicht vorliegen. Diese Arbeitsgruppe wies einen Abbau verschiedener Phosphatidylcholone, welche in den Fettsäuren differierten, nach Zugabe zellulärer Phospholipase nach.

Bei Substraten, die radioaktiv markierte Arachidonsäure an der *sn2*-Position tragen, kommt es hingegen zu anderen Ergebnissen. Gerade nach Inkubation mit markiertem Phosphatidylethanolamin wird durch differenzierte HL-60 Zellen nach Inkubation mit Calciumionophor Arachidonsäure in den Überstand freigesetzt unter Verringerung des Anteils von Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin in den Zellen. Dies entspricht den Veränderungen, die auch nach Aktivierung der Phospholipase A₂ zu erwarten sind. Im Falle von Phosphatidylethanolamin wird dieses Ergebnis durch Untersuchungen plausibilisiert, die die Existenz von Translokasen für dieses Lipid in der Membran nachwiesen (Devaux et al., 1990, Vance, 1991 und Sleight und Pagano, 1983). Die Ergebnisse, die man erhält, wenn man markierte, während eines Tages differenzierte Zellen mit Ionophor behandelt, spiegeln deutlich wider, daß nach dieser Differenzierungszeit die Phospholipasen noch nicht vorhanden bzw. aktiv sein können. Dies zeigt sich darin, daß nicht, wie in diesem Fall zu erwarten, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin unter Freisetzung der Arachidonsäure, sondern Phosphatidsäure und Phosphatidylserin abgebaut werden. Die Phospholipase C kommt allerdings in diesem Zusammenhang auch nicht in Frage, da sie in zur Bildung von Diacylglycerin führen müßte (Stone et al., 1988). Dagegen macht das Ergebnis eine Aktivität von Transacylasen wahrscheinlich.

Die Veränderungen, die sich nach Stimulierung von differenzierten HL-60 Zellen, die mit ¹⁴C-Ara-PC inkubiert wurden, ergeben, dürften ebenfalls nicht auf eine erhöhte Aktivität der Phospholipase A₂ zurückzuführen sein, da keinerlei Freisetzung der Arachidonsäure zu messen ist. Im diesem Zusammenhang könnten ebenfalls Transacylasen die entscheidende Rolle spielen. Zumindest können diese Enzyme die vorgefundene Umverteilung der Radioaktivität auf andere Lipide hervorrufen. Andererseits ist die Wirkung einströmenden Calciums nach Gabe von Ionophor so vielseitig, daß solche unspezifischen Veränderungen plausibel erscheinen.

Im Gegensatz zu Inkubationen mit Phosphatidylcholinen, die Palmitinsäure an der *sn2*-Position tragen, müssen bei Phosphatidylcholin, welches Arachidonsäure an der 2. Position trägt und bei Phosphatidylethanolamin andere Aufnahme- oder Umverteilungsvorgänge stattfinden, da hier ein Effekt durch Calciumionophor besteht. Dabei tritt nur im Fall des Phosphatidylethanolamins die nach Käfer et al., 1992 erwartete Freisetzung von Arachidonsäure auf. Bei Markierung mit diesem Lipid dürfte die Erklärung zum einen in einem andersartigen Aufnahmemechanismus liegen, da dieses Lipid sich bereits in der angebotenen Form als Vesikel mit seinen zum wässrigen Medium hin angeordneten Fettsäuren von den anderen Lipidvesikeln unterscheidet. Gleichzeitig müssen andererseits bei den untersuchten Zellen Translokasen für dieses Lipid vorhanden sein, da Lokalisationsdifferenzen für Lipid und Enzyme nicht bestehen.

Mit ¹⁴C-Ara-PC inkubierte Zellen zeigen keine Freisetzung von Arachidonsäure durch Inkubation mit Calciumionophor. Es existieren wohl zwar Enzyme für den Umbau nach der Aufnahme, aber keine Translokasen. Somit kommt es durch den Einfluß des Calciumionophors lediglich zu Transacylierungen.

Zusammenfassend läßt sich folgern, daß nach Inkubation mit Phosphatidylcholinen, deren Fettsäure an der 2. Position radioaktiv markiert ist, der Nachweis einer aktiven Phospholipase A₂ daran scheitert, daß die Lipide offensichtlich nicht in Bereiche gelangen, die für das Enzym zugänglich sind. Damit ist auch bewiesen, daß das Enzym bei HL-60 Zellen nicht an der dem Zytoplasma abgewandten Seite bei Zellorganellen sowie der Plasmamembran lokalisiert sein kann. Dort vorkommende Transacylasen wirken offensichtlich unterschiedlich in Abhängigkeit von der gebundenen Fettsäure.

Untersuchungen von Zellen, die mit C₆-NBD fluoreszenzmarkierten Lipiden inkubiert wurden

Fluoreszenzmarkierte Lipide sind durch den Fluoreszenzrest gegenüber nativen Lipiden in ihren Eigenschaften stark verändert. Daher sind vor allen weiteren Untersuchungen Aufnahme- und Umbaumechanismen zu kontrollieren. Da zudem alle Zellen unterschiedlich reagieren, stellen diese Ergebnisse weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet des Lipidmetabolismus und der Regulationsmechanismen dar.

Bei Inkubation von Zellen mit C₆-NBD-PC wird bei Kälte und anschließender kurzer Erwärmung die Plasmamembran durch dieses Lipid stark gefärbt, das Zytoplasma lediglich diffus. Sleight und Pagano, 1984 interpretieren dies bei der V79 Hamsterfibroblastenzelllinie als eine selektive Markierung der Zytoplasmamembran. Werden die Zellen auf 37 °C erwärmt, so führt dies zu einer Aktivierung der Enzyme für die Endozytose der fluoreszenzmarkierten Lipide. Es kommt zu einem langsamen Einbau in perinukleare Regionen. Bei ihnen handelt es sich wahrscheinlich um zelluläre Endosomen oder Lysosomen (Pagano, 1983). Bei den eigenen Untersuchungen war an dieser Stelle, besonders gut bei den NG- und NFB-Zellen, eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas zu erkennen.

Bei allen drei Zelllinien wie auch denen von Sleight und Pagano, 1984 sowie Furlong et al., 1992 untersuchten Zellen zeigt sich einheitlich, daß C₆-NBD-PC lediglich zu C₆-NBD-FS abgebaut wird, also kein Umbau zu anderen Lipiden stattfindet. Das läßt vermuten, daß zelluläre Enzyme entweder das fluoreszenzmarkierte Phosphatidylcholin nicht erreichen können oder es nicht als Substrat erkennen. Bishop und Bell, 1985 fanden allerdings eine Phosphatidylcholin-Translokase für ein kurzkettiges, nicht-fluoreszierendes Phosphatidylcholin, die allerdings zellabhängig unterschiedlich schnell arbeitet. Auch Zachowski et al., 1987 wies bei Lymphozyten eine Translokation von cholinhaltigen Phospholipiden nach, die nach McLean und Phillips, 1981 wesentlich langsamer vor sich geht als der Transport der Aminophospholipide. Da es, wie später noch diskutiert wird, bei den NFB-Zellen auf Grund einer Stimulierung der Phospholipase A₂ zu einem meßbaren Anstieg an C₆-NBD-FS kommt, dieses Enzym aber wahrscheinlich vorwiegend an der dem Zytoplasma zugewandten Seite liegt, muß demnach zumindest bei diesen Zellen eine Translokation stattfinden.

Nach Inkubation mit C₆-NBD-PA färbt sich im Gegensatz zu C₆-NBD-PC die Plasmamembran besonders stark, während das Zytoplasma praktisch keinen Fluoreszenzfarbstoff enthält. Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus des C₆-NBD-PA ergaben, daß C₆-NBD-PA nicht direkt in die Zelle transportiert, sondern an der Plasmamembran zunächst zu C₆-NBD-DG abgebaut wird. Dieses kann auf die andere Seite der Lipiddoppelschicht wechseln, wo es zu C₆-NBD-PA rephosphoryliert wird. Im weiteren Verlauf folgt die Bildung von C₆-NBD-PC, aber auch C₆-NBD-TG und C₆-NBD-FS entstehen (Pagano und Longmuir, 1985, Pagano et al., 1983, Pagano und Longmuir, 1983). Mit zunehmender Länge der Inkubation bei 37 °C sind bei HL-60 Zellen fluoreszierende Lipidtropfen im Zytoplasma bei gleichzeitig schwächerer Färbung des Endoplasmatischen Retikulums festzustellen. Bei den NG- und NFB-Zellen ist das "vorhergehende Stadium", in dem das Zytoplasma fluoreszierend strukturiert erscheint, gut zu erkennen.

Nach den Ergebnissen der Turnover-Untersuchungen findet sich auch nach Inkubation der drei Zelllinien mit C₆-NBD-PA C₆-NBD-DG, daneben die Produkte C₆-NBD-PC und C₆-NBD-FS. Die Substanzmenge der einzelnen Verbindungen variiert je nach Zelllinie.

Auffallend ist, daß die verschiedenen Zellen die Umbauten unterschiedlich schnell vornehmen. Sowohl NG-Zellen als auch NFB-Zellen weisen bereits während der Markierungsphase einen gegenüber HL-60 Zellen geringeren Turnover auf. Das könnte bei dieser Leukämiezelllinie der Grund sein, weshalb Substanzen wie C₆-NBD-DG nach Inkubation der Zellen mit C₆-NBD-PA nur in geringer Menge nachzuweisen sind.

Da C₆-NBD-PA als C₆-NBD-DG in die Zelle gelangt, erschien es möglich, durch diese Substanz einen vergleichbaren Umbau zu bewirken. Wie sich zeigte, nehmen mit C₆-NBD-DG inkubierte Zellen das markierte Lipid nur in geringer Menge auf, so daß, unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, praktisch keine Färbung der Zellen festzustellen ist.

Auch durch Markierung mit C₆-NBD-PE werden Zellen wie nach Markierung mit C₆-NBD-DG nicht angefärbt. Damit waren beide Substanzen für weitere Betrachtungen ungeeignet und wurde nicht näher untersucht.

Nach Inkubation mit C₆-NBD-PS kann in differenzierten HL-60 Zellen kein Turnover nachgewiesen werden. Im Unterschied zum Einsatz von C₆-NBD-PC zeigt sich, daß die Substanz bereits nach 60 Minuten zum Großteil zu C₆-NBD-FS abgebaut ist, welches überwiegend im Überstand vorliegt. Martin und Pagano, 1987 wiesen bei Versuchen mit V79 Fibroblasten eine Translokation von Lipidmonomeren auf die innere Seite der Plasmamembran nach, im Anschluß daran eine nichtspezifische Aufteilung zwischen den Membranen. Demzufolge wäre bei den eigenen Versuchen eigentlich die Möglichkeit zu Umbaumaßnahmen zu erwarten gewesen, die wie bei den V79 Fibroblasten die Bildung von C₆-NBD-PC bewirkt hätte. Denkbar wäre, daß der Transport von C₆-NBD-PS aus den HL-60 Zellen tatsächlich so schnell vor sich geht, daß solcherlei Vorgänge nicht stattfinden können bzw. sofort wieder rückgängig gemacht werden.

Untersuchungen zur Freisetzung fluoreszenzmarkierter Fettsäure nach Stimulierung der Phospholipase A₂ wurden bereits an anderen Zellen von Devaux et al., 1990 sowie Dagan und Yedgar, 1987 durchgeführt. Devaux wies eine Freisetzung aus mit C₆-NBD-PS inkubierten Erythrozyten nach externer Zugabe von Schlangen-Phospholipase A₂ nach. Yedgar setzte die Freisetzung von C₆-NBD-FS ohne vorherige Stimulierung von mit C₆-NBD-PC inkubierten Zellen in Beziehung zur Phospholipase A₂-Aktivität.

Die eigenen Versuche waren dagegen so angelegt, daß die zusätzliche Freisetzung von C₆-NBD-FS erst nach Inkubation mit Substanzen, die die zelluläre Phospholipase A₂ stimulieren, zu bestimmen war. Als Stimulantien kamen dabei zunächst bekannte, unspezifisch wirkende Substanzen, wie z.B. A23187 zum Einsatz. Mit ihrer Hilfe sollte die Funktionsfähigkeit der Aktivitätsbestimmung mittels fluoreszierender Lipide bei Kurzeiteinwirkung der Stimulantien überprüft werden. Damit sind zudem Vergleiche mit Versuchsansätzen, bei denen die Zellen zuvor mit radioaktiv markierten Lipiden inkubiert wurden, möglich. Mit dem Ziel, erstmals Aktivitätsbestimmungen bei Langzeiteinwirkung niedriger Dosen von Xenobiotika durchzuführen, wurden die in unserer Arbeitsgruppe verwendeten umweltrelevanten schwermetallorganischen Verbindungen eingesetzt. Unspezifisch wirkende Substanzen kamen für solche Untersuchungen nicht in Frage, da sie für die lange Inkubationsdauer von bis zu zwei Tagen letale Wirkung haben.

Wie sowohl Aufnahme- als auch Turnover-Untersuchungen ergaben, ist bei den drei betrachteten Zelllinien für die Phospholipase A_2 relevantes Substrat für Langzeituntersuchungen nur nach Inkubation der Zellen mit C_6 -NBD-PC oder C_6 -NBD-PA vorhanden.

Die beobachteten Reaktionen von Zellen, die mit C_6 -NBD-markierten Lipiden inkubiert und anschließend mit Stimulantien behandelt werden, lassen sich im Gegensatz zu den mit radioaktiv markierten Lipiden inkubierten in drei Gruppen einteilen:

Zum einen findet sich nach Stimulierung C_6 -NBD-PC inkubierter HL-60 Zellen ein im Vergleich zur Kontrolle höherer Anteil an C_6 -NBD-PC und ein niedrigerer an C_6 -NBD-FS. Da es, wie die Voraussetzung bei der Auswahl der Fluoreszenzmarkierung war, zu keiner Reacylierung der fluoreszierenden Fettsäure kommen kann, ist dieses Ergebnis nur über einen verminderten Abbau des C_6 -NBD-PC durch die Zelle zu erklären. Wenn der Abbau tatsächlich wie von Pagano behauptet (persönliche Mitteilung bei der DGZ in Bremen, 1989) in der Hauptsache durch unspezifische Enzyme an der Membran stattfindet, so deutet dies auf einen verminderten Transport der fluoreszierenden Lipide aus der Zelle unter dem Einfluß von Stimulantien. Dies deckt sich mit dem Ergebnis, daß in diesen Fällen die Fluoreszenz in stimulierten Zellen größer und dementsprechend im Überstand niedriger ist als in Kontrollzellen.

Bei einer zweiten Gruppe kommt es zu keinerlei Veränderung durch Stimulierung. Dies ist bei mit C_6 -NBD-PS inkubierten HL-60 Zellen, C_6 -NBD-PC markierten NG-Zellen und C_6 -NBD-PA markierten NFB-Zellen der Fall. Hier könnten sich entweder sich verminderter Heraustransport und Abbau durch Stimulierung die Waage halten oder es existiert, was unwahrscheinlich ist, tatsächlich keinerlei Einfluß. Im dritten Fall findet sich, entsprechend den Ergebnissen nach Inkubation mit radioaktiv markierten Lipiden, die erwartete Freisetzung von C_6 -NBD-FS nach Stimulierung der Phospholipase A_2 . Dies ist bei C_6 -NBD-PA markierten HL-60 Zellen und C_6 -NBD-PC markierten NFB-Zellen der Fall. Nicht ganz eindeutig ist das Ergebnis bei C_6 -NBD-PA markierten NG-Zellen.

Gezeigt hatte sich schon bei den Turnover-Versuchen, daß die Grundaktivität der Zellen sehr unterschiedlich ist. Dies mag ein Ansatzpunkt für die Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse nach Stimulierung C_6 -NBD-PC inkubierter Zellen sein. Bei den Turnover-Untersuchungen zeigte sich dies in Form eines unterschiedlich schnellen Abtransports von fluoreszenzmarkierten Lipiden aus der Zelle und dementsprechend eines von vorneherein größeren Abbaus des inkubierten Lipids an der Plasmamembran. HL-60 Zellen zeigen hier die größte Aktivität, NG-Zellen eine wesentlich geringere und NFB-Zellen nochmals eine geringere. Findet also tatsächlich durch Stimulierung ein verlangsamer Heraustransport gegenüber einem Kontrollansatz statt, so bewirkt er bei HL-60 Zellen einen höheren Gehalt an C_6 -NBD-PC als bei NG- oder sogar NFB-Zellen. Gleichzeitig ist das Ergebnis nach Stimulierung von NFB-Zellen nur über das Vorhandensein von Translokasen zu erklären. Nur damit kann das C_6 -NBD-PC so eingebaut werden, daß eine aktive Phospholipase A_2 das fluoreszierende Substrat erreichen kann. Die relativ geringe Stoffwechselaktivität dieser Zellen wirkt sich gerade beim Einsatz der geringen Dosen schwermetallorganischer Verbindungen positiv aus, da dadurch die Enzymaktivität offensichtlich höher ist als die Geschwindigkeit des Abtransports.

Bei NG-Zellen könnte die Phospholipase A_2 nicht verfügbar sein. So gibt es an diesen Zellen Untersuchungen, die ergaben, daß erst bei differenzierten Zellen Calcium-Kanäle nachweisbar sind (Nirenberg et al., 1983), die eine Stimulierbarkeit möglich machen. Speziell zur Stimulierung der NG-Zellen mit Bradykinin konnten Simonsson et al., 1989 nur eine Aktivierung der PLC, nicht aber die der Phospholipase A_2 nachweisen.

Bei Inkubation mit C₆-NBD-PA kommt es, wie bereits erläutert, schon allein durch den Aufnahmemechanismus zu einer Anordnung an der dem Zytoplasma zugewandten Seite. Es ist daher zu erwarten, daß ein Einfluß aktivierender Substanzen wie dem A23187 auch ohne notwendiges Vorhandensein von Translokasen für dieses Lipid nachgewiesen werden kann. Allerdings wird dies nur bei den HL-60 Zellen bestätigt. Bei den anderen untersuchten Zellen sind vermutlich wiederum den unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten für den fehlenden Nachweis verantwortlich.

Alle die durch Turnover- und Stimulierungsuntersuchungen gewonnen Erkenntnisse könnten allerdings durch Ergebnisse wie die von Bratton et al., 1991 in ihrer Bedeutung einen anderen Stellenwert erhalten. Er beschreibt eine Veränderung der Membransymmetrie als Folge von PAF-Bildung. Da aber, wie in der Einleitung dargestellt, eine aktive Phospholipase A₂ Voraussetzung für die Bildung von PAF ist, heißt das, daß sich als Folge einer Aktivierung die Membransymmetrie ändern kann. Dies läßt den Rückschluß zu, daß die Auswahl eines geeigneten zellulären Systems nicht nur von der Lipidkonstellation im unstimulierten Zustand abhängt, sondern zusätzlich eine Veränderung dessen als primäre Folge der Stimulierung möglich ist. Solcherlei Konstellationsänderungen sind bestimmt nicht zu verallgemeinern und damit vorhersehbar. Sie bieten aber eine weitere Erklärung dafür, wieso die Zelllinien so unterschiedlich reagieren, obwohl die Existenz einer durch die verwendeten Stimulantien aktivierbaren Phospholipase A₂ feststeht.

Vergleich der Zelllinien

Wie sich bei der bisherigen Diskussion herausstellte, sind für viele Differenzen in den Ergebnissen offensichtlich die Zellen verantwortlich. Der Vergleich der eigenen Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und der Turnover-Untersuchungen mit denen in der Literatur beschriebenen zeigt zwar Übereinstimmungen in den Grundaussagen; Im Detail gibt es jedoch Unterschiede:

Bereits das Erscheinungsbild bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung der Zellen ist nach gleicher Inkubationsdauer bei allen hier verwendeten Zellen unterschiedlich. Sleight und Abanto, 1989 unterstreichen die großen Unterschiede, die in der Anfärbbarkeit der Zellen und ihrer Organellen nach Inkubation mit C₆-NBD-PC entstehen. Auch die aus den angebotenen synthetisierten Lipiden gebildeten Produkte sind verschieden. Dabei dürften die Differenzen hauptsächlich in den Geschwindigkeiten liegen, mit denen die einzelnen Stadien erreicht werden. Dies bedeutet aber auch, daß manche Stadien im Mikroskop nicht zu finden sind, bzw. Substanzen nicht nachgewiesen werden können.

Zum Beispiel ist das Auftreten der Färbung der Lipidvesikel bzw. des Endoplasmatischen Retikulums je nach Zelllinie zeitlich versetzt. Bei HL-60 Zellen finden sich die fluoreszierenden Lipidtröpfchen sehr früh im Vergleich zu den NG- oder auch den NFB-Zellen. Nach Literaturangaben zeigt die Fibroblastenzelllinie V79 ein Erscheinungsbild, das zwischen dem der HL-60 und der NG-Zellen liegt. Färbungsmuster, die sich nach längerer Inkubation bei diesen Zellen zeigen, sind bei NG- und NFB-Zellen nicht zu finden. Damit lassen sich also nicht einmal die Fibroblastenzellen, hier durch die V79- und die NFB-Zellen repräsentiert, miteinander vergleichen. Ein markanter Unterschied zwischen diesen beiden Zellverbänden, der hier ausschlaggebend sein könnte, ist, daß es sich eben um eine etablierte Zelllinie bzw. um primäre Zellen handelt.

Auch bezüglich des Abbaus von C₆-NBD-PC bei Inkubation der Zellen bei 2 °C gibt es Unterschiede. Die beiden Fibroblastenzellarten NFB- und die aus der Literatur bekannten V79 Hamsterfibroblasten reagieren diesbezüglich deutlich verschieden. Durch die Kälte werden nach Pagano (persönliche Mitteilung bei der DGZ in Bremen, 1989) an der Außenseite der Plasmamembran vorhandene Enzyme, hierbei sind besonders Esterasen relevant, inaktiviert, so daß es an dieser Stelle nicht zu einem unspezifischen Abbau der fluoreszenzmarkierten Lipide kommt. Auf eine erhöhte Temperatur (Raumtemperatur) reagieren demgegenüber NFB-Zellen nicht mit einem vermehrten Abbau des C₆-NBD-PC zu C₆-NBD-FS. Dieser Unterschied könnte sowohl in der Herkunft (Hamster-Mensch) als auch in dem Unterschied primäre Zellen-Zelllinie begründet liegen.

Die Stärke des Abbaus von C₆-NBD-PC durch Zellen ohne Stimulierung irgendwelcher Enzyme ist ebenfalls bei allen untersuchten Zellen verschieden. Bei HL-60 Zellen ist schon nach sehr kurzer Inkubationszeit kaum C₆-NBD-PC vorhanden, während undifferenzierte NG- und vor allem NFB-Zellen noch nach 48 Stunden über ein knappes Drittel der Ausgangsmenge in den Zellen verfügen. Ein stärkerer Abbau ist gleichzeitig korreliert mit einem erhöhten Vorkommen von C₆-NBD-FS im Überstand. Daher erscheint es durchaus plausibel, daß der verstärkte Abbau durch einen vermehrten Transport des C₆-NBD-PC aus der Zelle und damit durch die Aktivität der Enzyme an der Plasmamembran zustandekommt. In diesem Fall würde die geringere Abbaurate von C₆-NBD-PC, die die NG- und NFB-Zellen an der Membran besitzen, mit einem geringeren Transport dieser Substanz aus der Zelle einhergehen. Die Geschwindigkeit des Transports fluoreszenzmarkierter Substanzen aus der Zelle in den Überstand ist auch bei den untersuchten Zellen unterschiedlich groß. Vergleicht man die meßbare Fluoreszenzintensität nach Extraktion der Lipide in Zellen und Überstand, so findet sich bei HL-60 Zellen wiederum nach kurzer Inkubationsdauer bei 37 °C bereits ein beachtlicher Teil im Überstand. Im Vergleich dazu ist der Anteil bei NG- und vor allem NFB-Zellen wesentlich geringer.

Wie schon bei der Betrachtung des Turnovers der verschiedenen Substanzen und Zellen festgestellt, findet sich eine etwas andere Zusammensetzung der fluoreszierenden Lipide. Da aber prinzipiell bei allen Zellen eine ähnliche Substanzpalette entsteht, kann angenommen werden, daß auch hier wiederum unterschiedlich schnelle Metabolisierungen stattfinden und damit manche fluoreszenzmarkierten Lipide gar nicht oder nur in geringem Maße zum Zeitpunkt der Messung vorhanden sind. Das könnte bei HL-60 Zellen der Grund sein, weshalb auch solche Substanzen wie C₆-NBD-DG nach Inkubation der Zellen mit C₆-NBD-PA kaum mehr aufzufinden sind. Eine Folge hiervon dürften die Unterschiede zwischen den Zellen nach Inkubation mit stimulierenden Substanzen sein.

Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so zeigt sich, daß sich weder die verwendeten menschlichen Zellen (HL-60 und NFB-Zellen) noch die gleichartigen Zellen (NFB-Zellen und V79 Fibroblastenzelllinie) gleich darstellen. Dagegen ist deutlich, daß die verschiedenen Zellen unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten besitzen. Ordnet man die Zelllinien nach steigender Aktivität, so ergibt sich folgende Reihenfolge:

NFB-Zellen < NG-Zellen < HL-60 Zellen

Gegenüberstellung der Ergebnisse der Radioaktiv- und der Fluoreszenzmarkierung nach Inkubation von Zellen

Bereits vom Ansatz her ergeben sich zwischen den Inkubationen mit den beiden verschiedenen Markierungen grundsätzliche Unterschiede: Fluoreszenzmarkierte Lipide werden von den Zellen im Gegensatz zu den radioaktiv markierten nicht als native Lipide erkannt und damit, wie bereits diskutiert, zum Beispiel auch bezüglich der aufgenommenen Menge anders behandelt. Von der Intention her ist der fluoreszierende Stoff zudem so gewählt, daß freiwerdende fluoreszierende Fettsäure nicht mehr reacyliert werden kann. Zusammen mit den Abbauvorgängen kommt es damit schon durch die Grundaktivität der Zellen und die äußeren Bedingungen zu einer Anreicherung der fluoreszierenden Fettsäure, was bei radioaktiv markierten Lipiden nicht der Fall ist.

Durch diesen unnatürlichen Aufbau der fluoreszierenden Lipide ist nicht nur der Wiedereinbau der Fettsäure behindert, sondern auch andere biochemischen Umbaureaktionen können häufig nicht in einem Umfang auftreten, der dem bei radioaktiver Markierung vergleichbar ist.

Hieraus resultieren auch die unterschiedlichen Reaktionen auf die Behandlung mit stimulierenden Reagentien. Reaktionen nach Markierung mit radioaktiven Lipiden dürften zwar nach Markierung mit fluoreszierenden Lipiden häufig in ähnlicher Weise, wenn auch geringerem Umfang stattfinden, werden dafür aber offensichtlich von anderen Phänomenen überlagert. Dazu gehört zum Beispiel eine Verringerung des Transports der fluoreszierenden Lipide aus der Zelle, was einen geringen Abbau zur Folge hat. Andererseits können durch radioaktive Markierung alle Biosynthesewege ungehindert ablaufen, wobei der Ein- und Umbau der Lipide offensichtlich aber noch keinen Maßstab für eine meßbare Reaktion auf stimulierende Reagentien darstellt.

Einsatzmöglichkeit zur Phospholipase A₂-Aktivitätsbestimmung

Mit den Ergebnissen der Ein- und Umbauuntersuchungen an den gewählten Zellkultursystemen sowie denen der Untersuchungen der Fluoreszenzmarkierungen konnten für die geplante Aktivitätsbestimmung der Phospholipase A₂ Grundlagen geschaffen werden. Sie machen in mehrfacher Hinsicht den sinnvollen Einsatz eines Bestimmungssystems mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Lipide deutlich: Nur durch die Verwendung der nicht reacylierbaren Fettsäure sind Langzeituntersuchungen bei Inkubation der Zellen mit niedrigen Dosen aktivierender Substanzen möglich. Auf diese Weise markierte Lipide können auch keinen Einfluß auf regulatorische Prozesse nehmen und damit zusätzliche, kaum mehr zu überschauende Effekte hervorrufen.

Es wurde gezeigt, daß bei der Aktivitätsbestimmung bestimmte Randbedingungen beachtet werden müssen, die die Problematik der Untersuchung fluoreszierender Substanzen sowie eine geeignete Kombination von Substrat und Zelllinie betreffen:

Aktivitätsbestimmungen mit Hilfe fluoreszierender Substrate haben den Nachteil, daß, wie auch bei Meyuhas et al., 1992 beschrieben, quenchende Effekte Probleme bereiten können. Dies wurde im vorliegenden Fall durch Verwendung des Lösungsmittels Methanol bei kontrollierter Einhaltung des Meßbereichs vermieden.

Da ein wichtiger Aspekt für die Entwicklung dieser Meßmethode Langzeituntersuchungen sind, ist es ratsam, Zellen zu verwenden, die das Substrat nicht von sich aus ohne Aktivierung der Phospholipase A_2 in einem größeren Maßstab abbauen. Nach den vorliegenden Untersuchungen bieten sich die NFB-Zellen besonders an. Diese haben zudem den Vorteil, daß es sich um menschliche, primäre Zellen handelt, somit Untersuchungen zu tatsächlichen, für den Menschen umweltrelevanten Einflüssen eine größere Signifikanz besitzen. Inwieweit die bessere Verwendbarkeit von primären Zellen in diesem Zusammenhang zu verallgemeinern ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Für Kurzzeituntersuchungen dürften wegen ihrer Einfachheit Messungen mit radioaktiver Markierung weiterhin zu bevorzugen sein. Langzeituntersuchungen zum Einfluß geringer Dosen, die eine chronische Stimulierung der Phospholipase A_2 bewirken, sind allerdings nur über die hier vorgestellte Aktivitätsmessung mittels fluoreszierender Lipide zu erreichen.

Die Auswahl eines geeigneten Substrats ist ebenfalls von grundlegender Bedeutung. C_6 -NBD stellt hierbei sicherlich ein Extrem bezüglich sterischer Eigenschaften und Polarität dar. Ergebnisse der Untersuchungen mit radioaktiv markierten Lipiden wie auch Literaturdaten von Baker und Chang, 1992 weisen darauf hin, daß die an der *sn*2-Position befindliche Fettsäure für die Abbaubarkeit ausschlaggebend ist. So wäre im vorliegenden Fall eine Fluoreszenzmarkierung an einer arachidonsäureähnlichen Fettsäure sicherlich von Vorteil. Da bei den anderen auf ihre Einbaubarkeit untersuchten Fettsäuren, insbesondere bei den längerkettigen, eine Reacylierbarkeit festgestellt wurde, dürfte es allerdings schwierig sein, Alternativen zum C_6 -NBD-FS zu finden.

Die Kombination der NFB-Zellen mit C_6 -NBD-PC als Substrat erwies sich als die geeignetste. Mit ihr kann nach Stimulierung eine Freisetzung der fluoreszenzmarkierten Fettsäure bewirkt werden. Der Vorteil des käuflich erwerblichen fluoreszenzmarkierten Lipids ist hierbei mit der Möglichkeit zu Langzeitversuchen kombiniert. Dies ist möglich, da diese Zellen nicht nur die fluoreszierenden Lipide wie nachgewiesen aufnehmen, sondern offensichtlich auch Enzyme besitzen, die sie an Stellen transportieren, zu denen eine aktive Phospholipase A_2 Zugriff hat. Der scheinbare Nachteil der geringen Affinität des aktiven Enzyms zum Substrat erweist sich bei der vorgestellten Aktivitätsmessung bei Langzeitbestimmungen als Vorteil. Somit existiert ein genügend großes Reservoir an Substrat, ohne daß von vorneherein für die Zelle schädlich große Mengen dieser artifiziellen Lipide vorhanden sein müssen. Präzise Bestimmungen sind trotzdem durch Trennung und Quantifizierung mit Hilfe der HPLC möglich.

Wie aus der Literatur bekannt (Ahlers et al., 1990; Bredlow et al., 1992), bestimmt der Aggregatzustand der Membran, also auch die Anordnung der fluoreszierenden Lipide zwischen den nativen, inwieweit ein Enzym aktiv werden kann. Die Frage bei der vorliegenden Messung ist dementsprechend, ob diese Anordnungen reproduzierbar, Aktivitätsbestimmungen also jeweils von Versuch zu Versuch übertragbar sind. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit davon abgesehen, Aktivitäten an Hand der freigesetzten Menge Fettsäure anzugeben. Die Klärung dieser Frage bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten demnach die Grundlage für ein Aktivitätsmeßverfahren mit weitreichenden Anwendungsmöglichkeiten, das bis zu seinem kommerziellen Einsatz noch durch abschließende Untersuchungen vervollständigt werden muß.

5 Literaturverzeichnis

Seite

- Ahlers M., Müller W., Reichert A., Ringsdorf H. und Venzmer J. (1990): "Spezifische Wechselwirkung von Proteinen mit funktionellen Lipidmonoschichten - Wege zur Simulation von Biomembranprozessen", *Angew. Chem.* **102**, 1310-1327 102
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. und Watson J.D. (1987 a): "Innere Membranen und die Synthese von Makromolekülen". In: "Molekularbiologie der Zelle", VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, S. 350-422 1, 2
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. und Watson J.D. (1987 b): "Die Plasmamembran". In: "Molekularbiologie der Zelle", VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, S. 277-349 2, 5
- Axelrod J., Burch R.M. und Jelsema C. (1988): "Receptor-mediated activation of phospholipase A₂ via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers", *TINS* **11**, 117-123 5
- Baker R.R. und Chang H.Y. (1992): "The hydrolysis of natural phosphatidylethanolamines by phospholipase A₂ from rat serum: a degree of selectivity is shown for docosahexaenoate release", *Biochim. Biophys. Acta* **1125**, 56-61 102
- Balet C., Clingman K.A. und Hajdu J. (1988): "1-palmitoyl-2-thiopalmityl phosphatidylcholine, a highly specific chromogenic substrate of phospholipase A₂", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 561-567 7
- Balsinde J., Diez E., Schüller A. und Mollinedo F. (1988): "Phospholipase A₂ activity in resting and activated human neutrophils", *J. Biol. Chem.* **263**, 1929-1936 4
- Barnes P.J., Chung K.F. und Page C.P. (1988): "Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease", *J. Allergy Clin. Immunol.* **81**, 919-934 5
- Bishop W.R. und Bell R.M. (1985): "Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: The phosphatidylcholine transporter", *Cell* **42**, 51-60 96
- Bligh E.G. und Dyer W.J. (1959): "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 13
- Bókay A. (1877-1878): "Ueber die Verdaulichkeit des Nucleins und Lecithins", *Zeitschrift für physiol. Chem.*, 157-164 4

Seite

- Bomalaski J.S., Baker D.G., Brophy L., Resurreccion N.V., Spilberg I., Muniain M. und Clark M.A. (1989): "A phospholipase A₂-activating protein (PLAP) stimulates human neutrophil aggregation and release of lysosomal enzymes, superoxide, and eicosanoids", *J. Immun.* **142**, 3957-3962 6
- Bonser R.W., Siegel M.I., McConnell R.T. und Cuatrecasas, P. (1981): "The appearance of phospholipase and cyclo-oxygenase activities in the human promyelocytic leukemia cell line HL60 during dimethyl sulfoxide-induced differentiation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **98**, 614-620 8, 94
- Bottenstein J.E. und Sato G.H. (1979): "Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 514-517 22
- Bratton D.L., Kailey J.M., Clay K.L. und Henson P.M. (1991): "A model for the extracellular release of PAF: the influence of plasma membrane phospholipid asymmetry", *Biochim. Biophys. Acta* **1062**, 24-34 99
- Bredlow A., Galla H.J. und Bergelson L.D. (1992): "Influence of fluorescent lipid probes on the packing of their environment. A monolayer study", *Chem. Phys. Lipids* **62**, 293-301 102
- Bretscher M.S. (1972): "Phosphatidyl-ethanolamine: differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent", *J. Mol. Biol.* **71**, 523-528 3
- Burch R.M. und Axelrod J. (1987): "Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 6374-6378 6
- Chang J., Musser J.H. und McGregor H. (1987): "Phospholipase A₂: Function and pharmacological regulation", *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2429-2436 4
- Collins S.J., Gallo R.C. und Gallagher R.E. (1977): "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture", *Nature* **270**, 347-349 11
- Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E. und 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 11

Seite

- Comfurius P. und Zwaal R.F.A. (1977): "The enzymatic synthesis of phosphatidylserine and purification by CM-cellulose column chromatography", *Biochim. Biophys. Acta* **488**, 36-42 20
- Comfurius P., Bevers E.M. und Zwaal R.F.A. (1990): "Enzymatic synthesis of phosphatidylserine on small scale by use of a one-phase system", *J. Lipid Res.* **31**, 1719-1721 20
- Cooke B.A., Dirami G., Chaudry L., Choi M.S.K., Abayasekara D.R.E. und Phipp L. (1991): "Release of arachidonic acid and the effects of corticosteroids on steroidogenesis in rat testis leydig cells", *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **40**, 465-471 93
- Cullis P.R. und Hope M.J. (1985): "Physical properties and functional roles of lipids in membranes". In: "Biochemistry of lipids and membranes" (Eds.: Vance DE. und Vance JE.), The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, Amsterdam, Mexico City, S. 25-72 3, 91
- Dagan A. und Yedgar S. (1987): "A facile method for direct determination of phospholipase A₂ activity in intact cells", *Biochem. International* **15**, 801-808 7, 97
- Dempsey C.E. (1990): "The actions of melittin on membranes", *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 143-161 6
- Dennis E.A. (1983): "Phospholipases". In: "The Enzymes" (Ed.: Boyer D.P.), Academic Press, Inc., New York, S. 340-345 4
- Dennis E.A., Lister M.D., Deems R.A. und Ulevitch R.J. (1989): "Phospholipase A₂ from a macrophage-like cell line", *Cell Activation and Signal Initiation* **106**, 369-378 94
- Devaux P.F. (1992): "Protein involvement in transmembrane lipid assymetry", *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 417-439 2
- Devaux P.F., Zachowski A., Morrot G., Cribier S., Fellmann P., Geldwerth D., Bitbol M. und Herve P. (1990): "Control of the transmembrane phospholipid distribution in eukaryotic cells by aminophospholipid translocase", *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**, 517-522 . . 2, 95, 97
- Diez E., Balsinde J. und Mollinedo F. (1990): "Subcellular distribution of fatty acids, phospholipids and phospholipase A₂ in human neutrophils", *Biochim. Biophys. Acta* **1047**, 83-89 4

	Seite
Furlong S.T., Thibault K.S. und Rogers R.A. (1992): "Fluorescent phospholipids preferentially accumulate in sub-tegumental cells of schistosomula of schistosoma mansoni", <i>J. Cell Sci.</i> 103 , 823-830	96
Ganong B.R. (1991): "Roles of lipid turnover in transmembrane signal transduction", <i>Am. J. Med. Sci.</i> 302 , 304-312	2
Gnamusch E., Kalas C., Hrastnik C., Paltauf F. und Daum G. (1992): "Transport of phospholipids between subcellular membranes of wild-type yeast cells and of the phosphatidylinositol transfer protein-deficient strain <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sec 14", <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1111 , 120-126	2
Gordesky S.E. und Marinetti G.V. (1973): "The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane", <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 50 , 1027-1031	3
Green J.A., Smith G.M., Buchta R., Lee R., HO K.Y., Rajkovic I.A. und Scott K.F. (1991): "Circulating phospholipase A ₂ activity associated with sepsis and septic shock is indistinguishable from that associated with rheumatoid arthritis", <i>Inflammation</i> 15 , 355-367	5
Hamprecht B. (1974): "Cell cultures as model systems for studying the biochemistry of differentiated functions of nerve cells", <i>Colloq. Ges. Biol. Chem.</i> 25 , 391-423	12
Hamprecht B., Glaser T., Reiser G., Bayer E. und Propst F. (1985): "Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma x glioma hybrid cells". In: "Methods of Enzymology Hormone Action, Band 109" (Eds.: Birnbaumer L. und O'Malley B.M.), Academic Press, New York, S. 316-341	13
Hanks J.H. und Wallace J.H. (1958): "Determination of cell viability", <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> 98 , 188-192	10
Hendrickson H.S., Kotz K.J. und Hendrickson E.K. (1990): "Evaluation of fluorescent and colored phosphatidylcholine analogs as substrates for the assay of phospholipase A ₂ ", <i>Anal. Biochem.</i> 185 , 80-83	7
Hirashima Y., Jurkowitz-Alexander M.S., Farooqui A.A. und Horrocks L.A. (1989): "Continuous spectrophotometric assay of phospholipase A ₂ activity hydrolyzing plasmalogens using coupling enzymes", <i>Anal. Biochem.</i> 176 , 180-184	7
Hoffmann G.E. und Neumann U. (1989): "Modified photometric method for the determination of phospholipase A activities", <i>Klin. Wochenschr.</i> 67 , 106-109	7

Seite

- Huang C. und Charlton J.P. (1972): "Studies of the state of phosphatidylcholine molecules before and after ultrasonic and gel-filtration treatments", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1660-1666 21
- Huang L. und Pagano R.E. (1975): "Interaction of phospholipid vesicles with cultured mammalian cells", *J. Cell Biol.* **67**, 38-48 93
- Irvine R.F. (1982): "How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?", *Biochem. J.* **204**, 3-16 5
- Ivanov A.G. (1991): "Phospholipase A₂ induced effects on the structural organization and physical properties of pea chloroplast membranes", *Photosynthesis Res.* **29**, 97-105 4
- Kaefer V., Goppelt-Strübe M. und Resch K. (1988): "Enhancement of eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages by the organic mercury compound thimerosal", *Prostaglandins* **35**, 885-902 6
- Käfer A., Zöltzer H. und Krug H.F. (1992): "The stimulation of arachidonic acid metabolism by organic lead and tin compounds in human HL-60 leukemia cells", *Tox. Appl. Pharmacol.* **116**, 125-132 6, 95
- Koltai M., Hosford D., Guinot P., Esanu A. und Braquet P. (1991): "Platelet activating factor (PAF): A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (part 1)", *Drugs* **42**, 9-29 4
- Kondakova I.V., Borunov E.V. und Antipova E.V. (1991): "Activation of phospholipase hydrolysis during oxidative cell damage", *Bull. Exp. Biol. Med.* **112** [9] 1299-1301 4
- Krug H. und Berndt J. (1987): "Stimulation of arachidonic acid metabolism via phospholipase A₂ by triethyl lead", *Eur. J. Biochem.* **162**, 293-298 6
- Krug H.F. (1992): "The toxic effects of organometals on the lands cycle in HL-60 cells", *Appl. Organomet. Chem.* **6**, 297-304 6, 7
- Krug H.F. und 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 6
- Lands W.E. und Merckl I. (1963): "Metabolism of glycerolipids; 3. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with α '-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis", *J. Biol. Chem.* **238**, 898-904 4

Seite

- Levrat C. und Louisot P. (1992): "Dual localization of the mitochondrial phospholipase A₂: outer membrane contact sites and inner membrane", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 719-724 4
- Lodish H.F. und Rothman J.E. (1979): "Die Bildung von Zellmembranen", *Spektrum der Wissenschaft* **3**, 30-47 2
- Lumb M.R., Roseblade C.K., Helmig R., Uldbjerg N., Sullivan M.H.F. und Elder M.G. (1990): "Use of a new simplified assay for phospholipase A₂ to measure bacterial enzyme levels", *Clin. Chim. Acta* **189**, 39-46 6
- Mäkelä A., Sternby B., Kuusi T., Puolakkainen P. und Schröder T. (1990): "Phospholipase A₂ activity and concentration in several body fluids in patients with acute pancreatitis", *Scand. J. Gastroenterology* **25**, 944-950 5
- Marshall L.A. und McCarte-Roshak A. (1992): "Demonstration of similar calcium dependencies by mammalian high and low molecular mass phospholipase A₂", *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1849-1858 5
- Martin O.C. und Pagano R.E. (1987): "Transbilayer movement of fluorescent analogs of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane of cultured cells", *J. Biol. Chem.* **262**, 5890-5898 97
- McLean L.R. und Phillips M.C. (1981): "Mechanism of Cholesterol and phosphatidylcholine exchange or transfer between unilamellar vesicles", *Biochemistry* **20**, 2893-2900 96
- Mehta D., Gupta S., Gaur S.N., Gangal S.V. und Agrawal K.P. (1990): "Increased leukocyte phospholipase A₂ activity and plasma lysophosphatidylcholine levels in asthma and rhinitis and their relationship to airway sensitivity to histamine", *Amer. Rev. Respir. Dis.* **142**, 157-161 5
- Meyer T., von Wichert P. und Weins D. (1989): "A rapid phospholipase A₂ bioassay using ¹⁴C-oleate-labelled E. coli bacterias", *Klin. Wochenschr.* **67**, 113-118 6
- Meyuhas D., Yedgar S., Rotenberg M., Reisfeld N. und Lichtenberg D. (1992): "The use of C₆-NBD-PC for assaying phospholipase A₂-activity: scope and limitations", *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 223-232 101
- Michal G. (1982): "Biochemical pathways", Kartenmaterial von Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica 1

Seite

- Morand O., Fibach E., Dagan A. und Gatt S. (1982): "Transport of fluorescent derivatives of fatty acids into cultured human leucemic myeloid cells and their subsequent metabolic utilization", *Biochim. Biophys. Acta* **711**, 539-550 89, 93
- Moreau R.A. (1989): "An evaluation of NBD-phospholipids as substrates for the measurement of phospholipase and lipase activities", *LIPIDS* **24**, 691-699 89, 90
- Morré D.J., Kartenbeck J. und Franke W.W. (1979): "Membrane flow and interconversions among endomembranes", *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 71-152 2
- Mouritsen O.G. und Jørgensen K. (1992): "Dynamic lipid-bilayer heterogeneity: a mesoscopic vehicle for membrane function?", *BioEssays* **14**, 129-136 1
- Naito M., Kudo I., Nakagawa Y., Waku K., Nojiri H., Saito M. und Inoue K. (1987): "Lipids of human promyelocytic leukemia cell HL-60: Increasing levels of ether-linked phospholipids during retinoic acid-induced differentiation", *J. Biochem.* **102**, 155-162 94
- Newburger P.E., Chovaniec M.É., Greenberger J.S. und Cohen H.J. (1979): "Functional changes in human leukemic cell line HL-60", *J. Cell Biol.* **82**, 315-322 11
- Nichols J.W. und Pagano R.E. (1981): "Kinetics of soluble lipid monomer diffusion between vesicles", *Biochemistry* **20**, 2783-2789 92
- Nichols J.W. und Pagano R.E. (1982): "Use of resonance energy transfer to study the kinetics of amphiphile transfer between vesicles", *Biochemistry* **21**, 1720-1726 93
- Nirenberg M., Wilson S., Higashida H., Rotter A., Krueger K., Busis N., Ray R., Kenimer J.G. und Adler M. (1983): "Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate", *Science* **222**, 794-799 98
- Oates J., Papahadjopoulos D. und Loyter A. (1982): "Membrane fusion events at the subcellular level", *TIPS* **6**, 222-224 21
- Ogura A., Myojo Y. und Higashida H. (1990): "Bradykinin-evoked acetylcholine release via inositol trisphosphate-dependent elevation in free calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells", *J. Biol. Chem.* **265**, 3577-3584 6
- Okajima F. und Kondo Y. (1992): "Synergism in cytosolic Ca²⁺ mobilization between bradykinin and agonists for pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled receptors in NG 108-15 cells", *FEBS Letters* **301**, 223-226 6

	Seite
Ostro M.J. (1987): "Liposomen", <i>Spektum der Wissenschaft</i> 3 , 94-103	21
Pagano R.E. (1983): "Intracellular processing of lipids: a theory based on studies with fluorescent lipids, liposomes, and cells". In: "Liposome letters" (Ed.:Bangham AD.), Academic Press, London, New York, S. 83-95	96
Pagano R.E. und Longmuir K.J. (1983): "Intracellular translocation and metabolism of fluorescent lipid analogues in cultured mammalian cells", <i>TIBS</i> 8 , 157-161	32, 90, 96
Pagano R.E. und Longmuir K.J. (1985): "Phosphorylation, transbilayer movement, and facilitated intracellular transport of diacylglycerol are involved in the uptake of a fluorescent analog of phosphatidic acid by cultured fibroblasts", <i>J. Biol. Chem.</i> 260 , 1909-1916	96
Pagano R.E., Longmuir K.J. und Martin O.C. (1983): "Intracellular translocation and metabolism of a fluorescent phosphatidic acid analogue in cultured fibroblasts", <i>J. Biol. Chem.</i> 258 , 2034-2040	89, 96
Pagano R.E., Schroit A.J., Struck D.K. (1981 a): "Interactions of phospholipid vesicles with mammalian cells in vitro: studies of mechanism". In: "Liposomes: From physical structure to therapeutic applications", Band 7 in der Reihe "Research monographs in cell and tissue physiology" (Ed.: Knight C.G.), Biomedical Press; Elsevier/North-Holland; Amsterdam, New York, Oxford, S. 323-346	91, 92
Pagano R.E., Martin O.C., Schroit A.J., Struck D.K. (1981 b): "Formation of asymmetric phospholipid membranes via spontaneous transfer of fluorescent lipid analogues between vesicle populations", <i>Biochemistry</i> 20 , 4920-4927	93
Pruzanski W. und Vadas P. (1991): "Phospholipase A ₂ - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation", <i>Immunol. Today</i> 12 , 143-146	5
Radom J., Salvayre R., Levade T. und Douste-Blazy L. (1990): "Influence of chain length of pyrene fatty acid on their uptake and metabolism by epstein-barr-virus-transformed lymphoid cell lines from a patient with multisystemic lipid storage myopathy and from control subjects", <i>Biochem. J.</i> 269 , 107-113	89, 90
Radvanyi F., Jordan L., Russo-Marie F. und Bon C. (1989): "A sensitive and continuous fluorometric assay for phospholipase A ₂ using pyrene-labeled phospholipids in the presence of serum albumin", <i>Anal. Biochem.</i> 177 , 103-109	7

- Ramesha C.S. und Taylor L.A. (1991): "Measurement of arachidonic acid release from human polymorphonuclear neutrophils and platelets: comparison between gas chromatographic and radiometric assays", *Anal. Biochem.* **192**, 173-180 7
- Rovera G., Santoli D. und 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 11
- Sandra A. und Pagano R.E. (1979): "Liposome-cell interactions", *J. Biol. Chem.* **254**, 2244-2249 93
- Saris N.E. und Somerharju P. (1989): "Fluorimetric assay of phospholipase A acting on biomembrane phospholipids", *Acta Chem. Scand.* **43**, 82-85 7
- Schanne F.A.X., Moskal J.R. und Gupta R.K. (1989): "Effekt of lead on intracellular free calcium ion concentration in a presynaptic neuronal model: ^{19}F -NMR study of NG 108-15 cells", *Brain Res.* **503**, 308-311 6
- Scherer G.F.E. und André B (1989): "A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A_2 in vivo and in vitro", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 111-117 ... 4
- Schrier S.L., Zachowski A., Hervé P., Kader J.C. und Devaux P.F. (1992): "Transmembrane redistribution of phospholipids of the human red cell membrane during hypotonic hemolysis", *Biochim. Biophys. Acta* **1105**, 170-176 2
- Schroit A.J., Madsen J.W. und Tanaka Y. (1985): "In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes", *J. Biol. Chem.* **260**, 5131-5138 2
- Schrör K. (1984): "Prostaglandine und verwandte Verbindungen", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 5
- Shier T. (1979): "Activation of high levels of endogenous phospholipase A_2 in cultured cells", *Proc. Natl. Acad. Sci* **76**, 195-199 6
- Simonsson P., Sun G.Y., Aaradottir S. und Alling C. (1983): "Bradykinin effects on phospholipid metabolism and its relation to arachidonic acid turnover in neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG 108-15)", *Cell. Signalling* **1**, 587-598 98

	Seite
Sleight R.G. und Abanto M.N. (1989): "Differences in intracellular transport of a fluorescent phosphatidylcholine analog in established cell lines", <i>J. Cell Science</i> 93 , 363-374	99
Sleight R.G. und Hopper K. (1991): "Evidence for the activity of a phospholipid exchange protein in vivo", <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1067 , 259-263	2
Sleight R.G. und Pagano R.E. (1983): "Rapid appearance of newly synthesized phosphatidylethanolamine at the plasma membrane", <i>J. Biol. Chem.</i> 258 , 9050-9058	95
Sleight R.G. und Pagano R.E. (1984): "Transport of a fluorescent phosphatidylcholine analog from the plasma membrane to the golgi apparatus", <i>J. Cell Biol.</i> 99 , 742-751	96
Sleight R.G. und Pagano R.E. (1985): "Transbilayer movement of a fluorescent phosphatidylethanolamine analogue across the plasma membranes of cultured mammalian cells", <i>J. Biol. Chem.</i> 260 , 1146-1154	2
Slivka S.R. und Insel P.A. (1988): "Phorbol Ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in madin-darby canine kidney cells", <i>J. Biol. Chem.</i> 263 , 14640-14647	6
Snyder F. (1985): "Chemical and biochemical aspects of platelet activating factor: a novel class of acetylated ether-linked choline phospholipids", <i>Med. Res. Rev.</i> 5 , 107-140	4
Stone R.M., Weber B.L., Spriggs D.R. und Kufe D.W. (1988): "Phospholipase C activates protein kinase C and induces monocytic differentiation of HL-60 cells", <i>Blood</i> 72 , 739-744	95
Struck D.K. und Pagano R.E. (1980): "Insertion of fluorescent phospholipids into the plasma membrane of a mammalian cell", <i>J. Biol. Chem.</i> 255 , 5404-5410	18
Struyer L. (1991 a): "Biosynthese der Vorstufen von Makromolekülen". In: "Biochemie", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York, S. 571-673	1
Struyer L. (1991 b): "Konformation, Dynamik und Funktion von Proteinen". In: "Biochemie", Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York, S. 147-324	1
Suga K., Kawasaki T., Blank M.L. und Snyder F. (1990): "An arachidonyl (polyenoic)-specific phospholipase A ₂ activity regulates the synthesis of platelet-activating factor in granulocytic HL-60 cells", <i>J. Biol. Chem.</i> 265 , 12363-12371	94
Tanaka Y. und Schroit A.J. (1983): "Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells", <i>J. Biol. Chem.</i> 258 , 11335-11343	2

Seite

- Vance J.E. (1991): "Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum", *J. Biol. Chem.* **266**, 89-97 2, 93, 95
- Verkleij A.J., Zwaal R.F.A., Roelofsen B., Comfurius P., Kastelijn D. und van Deenen L.L.M. (1973): "The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane", *Biochim. Biophys. Acta* **323**, 178-193 3
- Voelker D.R. (1990): "Lipid transport pathways in mammalian cells", *Experimentia* **46**, 569-579 3, 94
- Waite M. (1985): "Phospholipases". In: "Biochemistry of Lipids and membranes" (Eds.: Vance DE. und Vance J.E.), The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, Amsterdam, Mexico City, S. 299-324 4
- Waite M. (1987): "Functions of phospholipases". In: "Handbook of lipid research", Band 5: "The Phospholipases" (Ed.: Hanahan D.J.), Plenum Press, New York, London, S. 243-281 4
- Wijermans P.W., Ossenkoppele G.J., Huijgens P.C., Imandt F.M., DeWaal F.C. und Langenhuijsen M.M. (1987): "Quantitative enzyme determination; a parameter for leukemic cell differentiation", *Leukemia Res.* **11**, 641-648 12
- Wilton D.C. (1990): "A continuous fluorescence displacement assay for the measurement of phospholipase A₂ and other lipases that release long-chain fatty acids", *Biochem. J.* **266**, 435-439 7
- Wittenauer L.A., Shirai K., Jackson R.L. und Johnson J.D. (1984): "Hydrolysis of a fluorescent phospholipid substrate by phospholipase A₂ and lipoprotein lipase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 894-901 7, 90
- Wolf D.E., Winiski A.P., Ting A.E., Bocian K.M. und Pagano R.E. (1992): "Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogues by nonradiative fluorescence resonance energy transfer", *Biochemistry* **31**, 2865-2873 90
- Yano K., Higashida H., Inoue R. und Nozawa Y. (1984): "Bradykinin-induced rapid breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in neuroblastoma x glioma hybrid NG 108-15 cells", *J. Biol. Chem.* **259**, 10201-10207 6
- Yedgar S., Reisfeld N., Halle D. und Yull I. (1987): "Medium viscosity regulates the activity of membrane-bound and soluble phospholipase A₂", *Biochemistry* **26**, 3395-3401 90

Seite

- Yin C.C., Lin B.Z. und Hauser H (1991): "Phase behavior of phosphatidic acid". In: "Progress in membrane biotechnologie" (Eds.: Gomez-Fernandez, Chapman, Packer), Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, S. 30-39 91
- Zachowski A., Herrmann A., Paraf A. und Devaux P.F. (1987): "Phospholipid outside-inside translocation in lymphocyte plasma membranes is a protein-mediated phenomenon", *Biochim. Biophys. Acta* **897**, 197-200 2, 96
- Zimmermann G.A., Prescott S.M. und McIntyre T.M. (1992): "Platelet-activating factor: A fluid-phase and cell-associated mediator of inflammation". In: "Inflammation: Basic principles and clinical correlates" (Eds.: Gallin JI., Goldstein IM., und Snyderman R.), Raven Press, Ltd., New York, S. 149-176 5