

**Mechanismen der Störung der purinergen Signaltransduktion bei Humanmakrophagen
und Excitabilität boviner chromaffiner Zellen durch Polychlorierte Biphenyle**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades an der
mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Markus Dehnhardt

aus Staufenberg/Nienhagen

Düsseldorf im Juli 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Korreferent: Prof. Dr. H. Wiegand

Tag der mündlichen Prüfungen: 06. Juli 2001

Meiner Verwandtschaft

Gliederung:	Seite:
1. Einleitung:	7
1.1 Polychlorierte Biphenyle	7
1.1.1 Struktur, Vorkommen und Umweltrelevanz	7
1.1.2 Humandaten zur PCB-Exposition, in vitro Studien und Organtoxizität	10
1.1.3 allgemeine Toxizität	12
1.1.4 spezielle Toxizität und Organpathologie beim Menschen	17
1.1.5 Metabolismus	25
1.2 Humanmakrophagen: Schnittstelle zwischen Nerven- und Immunsystem	29
1.2.1 Regulation des Calciumhaushalts des Makrophagen	34
1.2.2 System purinerner Rezeptoren	38
1.2.3 Gewebeverteilung der Purinrezeptoren	40
1.2.4 induzierbare Stickstoffoxydsynthase (iNOS)	44
1.2.5 Calciumcalmodulinkinase II (CaCAMK II)	50
1.2.6 zyklische Nukleotide und zelluläre Phosphodiesterasen	53
1.3 bovine chromaffine Zellen	55
1.3.1 klinische Aspekte gestörter Katecholaminsekretion	56
1.3.2 Calciumantagonisten	57
2. Fragestellung:	59
3. Materialien und Methoden:	61
3.1 Zellkulturen von peripheren Blutmonozyten abgeleiteten Humanmakrophagen	61
3.2 Zellkultur primärer boviner chromaffiner Zellen	62
3.3 Kulturmedien und Zellvitalitätsprüfungen	63
3.3.1 Kulturmedien	63
3.3.2 Zellvitalitätsprüfungen	65
3.3.3 Behandlung der Zellen	66

3.3.4 Methoden	68
3.3.4.1 Die patch-clamp-Methode:	68
3.3.4.1.1 Ableitungen	68
3.3.4.1.2 patch-clamp-Konfigurationen	70
3.3.4.1.3 verwendete Lösungen	71
3.3.4.2 Calcium-Spektrofluorimetrie: Prinzip Durchführung, Versuchsansätze und Lösungen	73
3.3.4.3 Immunohistochemie	80
3.3.4.4 TNF α -Cytokin-Assay	82
3.3.4.5 Boten-RNA-Nachweis mittels Reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion, PCR	84
3.3.4.6 Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (FACS):	89
3.3.4.7 Fluorescein-Isothiocyanat-Markierung von anti-humanen P2X₇-Rezeptor- und anti-humanen P2X₁-Rezeptor-Antikörpern	90
3.3.4.8 Lebendfärbung von Humanmakrophagen für das α-Integrin CD 11c	93
3.3.4.9 Gesamtnitrit-Freisetzungs-Assays zur Bestimmung der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase- Funktion nach PCB 47	94
(a) Calbiochem-Assay zur Gesamtnitritbestimmung	96
(b) Nitritbestimmung mit der Griessreaktion	97
3.3.4.10 Enzym-Immunoassays zum Nachweis von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP)- und ~ Guanosinmonophosphat (cGMP)	98
3.3.4.11 Chemikalienliste und Basischemikalien	100
3.3.4.12 Fotos	103
3.3.4.13 Statistik	103
3.3.4.14 Index der Abkürzungen zu den Versuchen	104

4. Ergebnisse:	105
4.1: Humanmakrophagen	105
4.1.1 Charakterisierung der Makrophagen-Zellkultur	
4.1.1.1 <u>elektrophysiologisch</u> : Entwicklung eines Kaliumauswärtsgleichrichters	105
4.1.1.2 <u>immunologisch</u> : Lebendfärbung mittels monoklonalem Antikörper gegen das Differenzierungsclusterprotein CD11c	107
4.1.1.3 <u>morphologisch</u> : Rasterelektronenmikroskopie	108
4.1.2 Zellvitalitätsprüfungen und Funktionstests mit ATP: Erst- und Zweitantwort	109
4.1.3 Akut-Exposition mit PCBs	114
4.1.4 ATP- und Purinderivate:	117
4.1.4.1 Konzentrations-Effektbeziehungen	117
4.1.4.2 Scatchard-Plots	119
4.1.4.3 PCB-Abhängigkeit der ATP-Antwort	121
4.1.4.4 Stereoselektivität der PCB-veränderten ATP-Antwort	122
4.1.4.5 Inhibitoren: Suramin und XAMR	124
4.1.5 Funktion und Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase (iNOS)	129
4.1.5.1 N ^c -Amino-L-Arginin, ein Inhibitor der iNOS	129
4.1.5.2 Immunohistochemie	134
4.1.5.3 Inhibition der ATP-Antwort durch den NO-Donor S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin, SNAP	136
4.1.5.4 Gesamtnitrit-Freisetzung	138
4.1.6 Agonistenscreening für veränderte Liganden-Potenz nach PCB 47 an spezifischen ATP-Rezeptoren	139
4.1.6.1 spezifische Agonisten	139
4.1.6.2 Agonisten nach PCB 47-Vorbehandlung	141
4.1.7 P2X ₇ -Antagonist und Calcium-Calmodulinkinase-Inhibitor KN-62	143
4.1.8 hohe zelluläre Spiegel an zyklischen Nukleotiden	146

4.1.8.1	erhöhter cAMP-Spiegel	146
4.1.8.2	erhöhter cGMP-Spiegel	148
4.1.9	Konzentrations-Effektbeziehung für 2',3'-o-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP	151
4.1.10	Phospholipasen C und D	152
4.1.11	Calcium-Entzugsexperimente	154
4.1.12	Verringerung des basalen und stimulierten zytosolischen Gehaltes an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) nach PCB 47	159
4.1.13	verringerte Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- α)-Freisetzung nach PCB 47	164
4.1.14	zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)	166
4.2	bovine chromaffine Zellen	172
4.2.1	Calcium-Spektrofluorimetrie	172
4.2.2	Beeinflussung der Spannungsabhängigkeit von Calciumleitfähigkeiten in der Extrazellulärmembran nach akuter PCB-Zugabe	175
4.2.3	Einzelkanal-Ableitungen nach subchronischer PCB-Applikation	184
5.	Diskussion:	190
6.	Zusammenfassung:	234
7.	Literatur:	235
8.	Index der Abbildungen, Tabellen und Fotos:	249
9.	Publikationsliste:	252
10	Glossar und Index der Abkürzungen:	253
	Danksagung	261

1. Einleitung:

1.1 Polychlorierte Biphenyle

1.1.1 Struktur, Vorkommen und Umweltrelevanz

Polychlorierte Biphenyle existieren in 209 verschiedenen Verbindungen und werden in der Regel als Gemische seit 1929 in industriellen Produktionsprozessen in erster Linie als Schmier- und Anti-Klopfmittel, Dielektrikum in Kondensatoren, Isolier- und Kühlflüssigkeit von Hubwerkzeugen der Hydraulik und Pumpenanlagen eingesetzt, in offenen Systemen als Schmiermittel in Getriebeölen und Schraubenfetten, aber auch als Weichmacher für Lacke und Harze, als Papierbeschichtungsmittel, Pestizid-Zusatz und in Antifoulingfarben von Bootslacken. Durch große Hitzestabilität, schwere Entzündlichkeit und dielektrische Eigenschaften bei gleichzeitig geringen Produktionskosten erwiesen sie sich als geradezu universell einsetzbar.

Durch ihre Lipophilie lösen sie sich außerordentlich gut in apolaren Lösungsmitteln und werden mit steigendem Chlorierungsgrad amphiphiler und viskoser und liegen immer als Substanzgemische vor. Die erste Substanzbeschreibung mit toxikologischem Hintergrund erfolgte 1956 bis zum Verbot der Verwendung und industriellen Produktion auch in geschlossenen Systemen in der Bundesrepublik Deutschland durch den Gesetzgeber 1983.

Seit dem generellen Verbot von 1989 dürfen PCBs in die Bundesrepublik weder importiert noch dürfen sie exportiert werden.

Seit 1988 werden nach Empfehlung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Organisation für Ökonomische Kooperation und Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) PCB-Gemische nach 6 Leitkongeneren bewertet (Indikator-PCBs: 28, 52, 101, 138, 153 und 180, zur Nummerierung s. Anhang), und als annehmbare Tagesdosis (TDI) wurden 1-3µg/kg x Tag (Empfehlung der DFG,1988) empfohlen, der acceptable daily intake (ADI) wurde bereits 1983 vom Bundesgesundheitsamt in Zusammenarbeit mit dem Umweltbundesamt auf 1µg/kg festgelegt (Umweltbundesamt, Stoffmonographie PCB,1999).

Analytische Schätzungen ergaben, dass die durchschnittliche tägliche Aufnahme durch den Menschen bei etwa 0.1µg/kg Körpergewicht liegt, bei Säuglingen mit 2-3µg/kg x Tag über die Muttermilch alleine für die Kongenere 153, 138 und 180.

Mittlerweile ist man aber, um die unterschiedliche Persistenz, kinetischen Eigenschaften und den Metabolismus zu berücksichtigen, zur Einzelbewertung der Kongenere übergegangen (G.Koss,1997).

Diese bezieht sämtliche zur Verfügung stehenden toxikologischen Informationen im Vergleich mit der mit 'eins' am höchsten bewerteten halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoff-Verbindung 2,3,7,8 TCDD (Tetrachlordibenzodioxin) hinsichtlich der Bemessung eines Gefährdungspotentials ein (Toxizitäts-Äquivalenz-Faktor).

Dass Polychlorierte Biphenyle heutzutage immer noch ein Gefährdungspotential für den Menschen darstellen, beruht zum einen auf ihrer sehr langen Persistenz, zum anderen auf ihrer Entstehung bei

vor allem industriellen Verbrennungsprozessen, bei der Müllverbrennung, sind unter anderem im Zigarettenrauch enthalten und reichern sich im Fettgewebe und somit in der Nahrungskette an. Zum anderen sind als Emissionsquellen Baustoffe anzusehen, die in Bauten vor Beginn der achtziger Jahre, vorallem Preßspanplatten sowie in Farben und Lacken, eingesetzt wurden (G. Koss, 1997).

Kongenere:

Nach Anzahl und Position des/der Chlorsubstituenten erfolgt die Nomenklatur in Bezug auf die Dibenzolbindung mit möglichst kleiner Ordnungszahl:

* allgemeine Struktur:

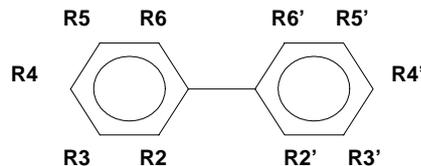


Abbildung 1: Nomenklatur der Polychlorierten Biphenyle nach Position der Substituenten.
mit R = Sitz und Numerierung der Chlorsubstituenten

So erhält das 2-Monochlor-Biphenyl die IUPAC-Nummer 1, das 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-Decachlor-Biphenyl die IUPAC-Nummer 209.

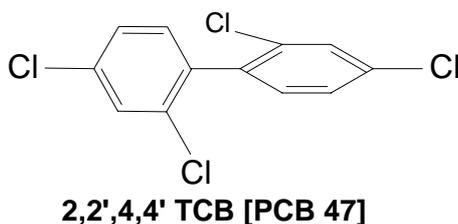
Struktur und räumliche Anordnung:

Bei orthochlorierten Biphenylen ist die sterisch günstigste räumliche Anordnung der beiden Benzolringe durch die Chloratom-Elektronenwolken senkrecht zueinander. Sie werden daher als nicht-koplanar bezeichnet.

Die sterisch günstigste räumliche Anordnung nicht-orthochlorierter Biphenyle ist koplanar, das heißt, beide Benzolringe liegen in einer Ebene

* nicht-koplanare PCBs:

Bsp.: 2,2',4,4' Tetrachlorobiphenyl (PCB 47)
orthochloriert, die sterisch günstigste Anordnung ist daher nicht-planar
sterische Anordnung der PCB-Kongenere:



* koplanare PCBs:

Bsp.: 3,3',4,4' Tetrachlorobiphenyl (PCB 77)
nicht-orthochloriert, die sterisch günstigste Anordnung ist daher planar

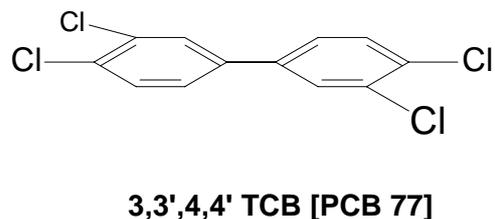


Abbildung 2: räumliche Anordnung von verschiedenen PCB-Kongenere nach Position und Zahl der Chlorsubstituenten.

Das toxikologische Potential der verschiedenen PCB-Kongenere unterscheidet sich erheblich nach Sitz und Anzahl der Chloratome im Molekül, sowie nach Expositions- respektive Aufnahmepfad.

Die Biotransformation im menschlichen Organismus nimmt mit steigender Zahl der Chloridreste im Molekül ab. (PCB 3: 4-Monochlor-Biphenyl 95-97%. Zum Vergleich: PCB 180: 2,2',3,4,4',5,5').

Heptachlorbiphenyl: 5% (G. Koss, 1997).

Beim Studium industriell produzierter PCB-Gemische ist zusätzlich zur intrinsischen PCB-Toxizität weiterhin problematisch, dass stets polychlorierte Dibenzodioxine (PCDD) und polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) als Kontaminanten enthalten sind.

physiko-/chemische Eigenschaften:

PCBs sind sowohl chemisch als auch physikalisch außerordentlich stabil, besitzen eine ölige Konsistenz [das alles über einen Temperaturbereich von mehreren 100°C], widerstehen der Entflammbarkeit und sind in der Lage, die Leitung von Elektrizität zu unterbinden. Aus diesen Gründen wurden PCBs in vielen offenen Systemen (Kühlschmierstoffe, Farben, Weichmacher) und geschlossenen Kreisläufen verwendet, nach Schätzwerten in den alten Bundesländern 1989: 24000t in offenen und 59000t in geschlossenen Systemen. Beim Produktionsvorgang entsteht immer ein Gemisch vieler verschiedener PCBs. Mechanistisch erfolgt die Herstellung durch Chlorierung von Biphenyl, das je nach späterem Verwendungszweck niedrig oder höher chloriert synthetisiert wird.

polychlorierte Biphenyle sind Bestandteil verschiedener technischer Systeme:

Die in geschlossenen Systemen Verwendung findenden Kongenergemische bedingen eine potentielle humane Expositionsgefährdung vor allem in der Herstellung und bei Unfällen im Transport oder in der Betriebsdauer. Das gilt für die PCB-Verwendung als Dielektrikum für Groß- und Kleinkondensatoren, in Isolier- und Kühlflüssigkeit für Transformatoren und Gleichrichter, Hydraulikflüssigkeit in Hubwerkzeugen und Pumpenanlagen und als Wärmeüberträger in elektrisch beheizten Radiatoren und anderen Anlagen.

Polychlorierte Biphenyle finden sich in offenen Systemen als Schmiermittel in Getriebeölen, Hochdruckpumpenölen und Schraubenfetten, Weichmacher für Lacke und Harze in Öl- und Emulsionsfarben, Vinylchlorid-, Nitrozellulose- und Epoxyfarben sowie für Polyurethan- und Chlorkautschuk-Anstrichfarben.

Desweiteren als Weichmacher für Kunststoffe wie PVC, Polyethylen, Polystyrol, Polyamide, Kautschuk und Polyurethanschaumstoffe, Papierbeschichtungsmittel für Transparent- und Kopierpapier, in Ölimmersionen für die Mikroskopie, als Bestandteil von Antifoulingfarben vorallem in Bootslacken, Pestizid-Zusatz, Bestandteil von Klebern, Bestandteil von Schutzmitteln gegen Entflammen und in dauerelastischen Dichtungsmassen.

Die Nomenklatur der PCB-Gemische ist einheitlich nur für die jeweiligen Herstellungsländer geregelt. Der Name läßt immer das Herkunftsland erkennen (siehe Anhang).

Um Grad der Kontaminationen von Umwelt und Lebensmitteln zu ermitteln, wurde seit den 80er Jahren konventionsgemäß in jeder Matrix die Konzentration von sechs verschiedenen

Einzelsubstanzen ('Indikator-polychlorierte Biphenyle') gemessen. Sofern auf den Gesamt- PCB-Gehalt zu schließen ist, wird der ermittelte Summenwert der sechs Kongenere mit fünf multipliziert [die Auswahl der Kongenere erfolgt nicht nach toxikologischen Bedeutung, sondern willkürlich aus analytischen Gründen]. Unterschiedliches metabolisches und kinetisches Verhalten spielt dabei ebensowenig eine Rolle, wie die toxikologische Bedeutung der einzelnen Kongenere im Verteilungsmuster in Kreisläufen zwischen den einzelnen Kompartimenten.

Mittlerweile geht man zur angemessenen Beurteilung Kongeneren-spezifisch vor ('Einzelsubstanz-beurteilung'). Für Dibenzodioxine und -furane existiert ein Summationskonzept [Toxizitäts-Äquivalenzfaktoren-Konzept].

Das Bundesgesundheitsamt hat 1983 als Grenzwerte (tolerable daily intake, tdi respektive acceptable daily intake= 1-3µg/kg Körpergewicht) vorgeschlagen.

DFG und OECD haben 1988 einen Grenzwert von 1µg / kg Körpergewicht empfohlen [ausgehend von der Schätzung, dass bei Einhaltung dieses Wertes und lebenslanger Exposition gesundheitliche Risiken vermieden werden].

1.1.2 Humandaten zur PCB-Exposition, in vitro Studien und Organtoxizität:

Die Resorptionsquoten von PCBs beim Menschen hängen entscheidend von Chlorierungsgrad, Expositionspfad und dem Lipidgehalt im Blut ab.

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der PCBs werden diese überwiegend über lipidreiche Lebensmittel wie Milch und Milchprodukte, Fisch und Fleisch aufgenommen.

Untersuchungen an Ratten ergaben Resorptionsquoten von über 90 % in die Darmmucosa-Zellen unabhängig vom Chlorierungsgrad und Höhe der Dosis. Erst bei höher chlorierten PCBs verringert sich die Resorptionsquote über diese Epithelien [Oktachlorbiphenyle ~ 75 %].

Die Resorption über die Atemluft und das Lungenepithel ist vermutlich vergleichsweise gering. Eine Ausnahme diesbezüglich stellen aber die Clara-Zellen dar, die offensichtlich PCB-Kongenere über Arenoxid-Intermediate Glutathion-abhängig zu Methylsulfonderivaten metabolisieren können und spezifisch akkumulieren (siehe Metabolismus).

Die Aufnahme über die Haut [dermale Resorption; in Abhängigkeit des Trägerstoffes] liegt bei 20,4 % innerhalb von 24h eines technischen Gemisches [Aroclor 1242; bei Rhesusaffen], bei einer Menge von 4.1µg/cm² in Mineralöl aufgetragen.

Beim Menschen liegen - nach Untersuchungen des Fettgewebes exponierter Personen - die Resorptionsquoten ähnlich hoch.

Vom Resorptionsort werden die PCB über die Blutzirkulation in alle Gewebe des Körpers verteilt.

Wie Untersuchungen gezeigt haben, ist dabei der Anteil der vom Blut transportierten und verteilten PCB-Menge nahezu der resorbierten gleich, die Verteilung über die Lymphe ist vernachlässigbar.

Die Verteilung auf die Kompartimente über den Blutstrom erfolgt hauptsächlich über Assoziation an die Lipoprotein- und Plasmaproteinfraktion.

Im Gewebe von Leber, ZNS und Fettgewebe finden sich Tetrachlorbiphenyle praktisch ausschließlich in der Lipidfraktion. Höher chlorierte PCB (Hexachlorbiphenyle) verteilen sich zu 90% auf Lipid- und 10 % auf Proteinfraktion.

Die Verteilung vom Blut auf die Gewebe wird durch die lipophilen Eigenschaften der Kongenere und den Gehalt an Lipiden im Gewebe wesentlich bestimmt.

In Geweben mit hohem Lipidanteil ist die Anreicherung (Akkumulation) ein bekanntes Phänomen. Dieses wird bestimmt durch die chemische Stabilität und den Metabolismus einerseits und die Position der Chloratome andererseits.

Retrospektive Kohortenstudien am Menschen haben gezeigt, dass die Akkumulation im Fettgewebe umso größer ist, je größer die Zahl an ortho-Substituenten ist.

Die Verstoffwechslung der PCBs erfolgt über eine Biotransformation im Phase II Metabolismus als Entgiftungsreaktion. Die Zunahme der Wasserlöslichkeit und damit der Ausscheidung erfolgt durch Einführung von phenolischen OH-Gruppen und Konjugation mit Glukuron- und Schwefelsäure (speziesspezifisch), sowie mit Glutathion.

Nach S.H. Safe (1994) und anderen erfolgt aber auch eine Giftungsreaktion über postulierte Arenoxyde (siehe Teil II der Einleitung: Metabolismus).

Als Halbwertszeit (vor allem für Tetrachlorobiphenyle) werden 2.0 - 2.6 Jahre im humanen Organismus angegeben. Diese variiert aber teilweise erheblich in Abhängigkeit von sterischen und physikochemischen Eigenschaften der Einzelkongenere und ist für niederchlorierte Verbindungen kürzer.

Aufnahmepfade für PCBs:

Bei gleicher Menge PCBs kann man eine Aufnahmeabfolge nach *oral* > *inhalativ* > *dermal* aufstellen.

Nach ihrer Verwendung in industriellen Produktionsprozessen hatte man nach Unfällen in Fernost (1968 in der japanischen Provinz Kyushu, Yusho-Krankheit) und 1979 in der taiwanischen Provinz Taichung (Yu Cheng) nach Verzehr von kontaminiertem Reisöl und in den USA bzw. Schweden 1981, 1982 und 1988 und in Seveso, Italien 1986 anhand von epidemiologischen Studien erste Ansätze zur toxikologischen Bedeutung von PCBs nach Humanexposition.

Bei Intoxikationen durch PCB nach Verbrennungsprozessen oder Erhitzen sind zudem höhere Level an polychlorierten Dibenzofuranen und polychlorierten Quartärphenylen zu erwarten, die oftmals ein erheblich höheres toxisches Potential besitzen als PCBs.

Bezüglich auftretender Krankheitsbilder und Lethalität beim Menschen nach akuter, subchronischer oder chronischer PCB-Exposition liegen bis heute kaum Längsschnittstudien vor (Koss, G., 1997).

Nahrungskette:

In verschiedenen Regionen der Erde ist der PCB Gehalt im Bodensediment, in aquatischen Ökosystemen und somit auch in der Nahrungskette aufgrund erhöhten Eintrags ein besonderes Problem. Dies gilt vorallem für Arktis, die großen Seen in den Vereinigten Staaten, sowie die Baikalsee-Region (Vilje et al., 1995) und für die in den entsprechenden Ökosystemen integrierten Organismen.

Zudem zeigen Kohortenvergleiche verschiedener, supranationaler Kohorten gewisse Unsicherheiten der Datenkonsistenz, vorallem was mögliche Confounder bekannter Neurotoxizität betrifft, wie gleichzeitige Quecksilber- und Bleibelastung (Winneke 1995).

Gängige Pharmakokinetische Modelle zur PCB-Aufnahme, Verteilung und Elimination existieren von Lutz et al. (1977) und Krishnan und Andersen (1994) neben vielen anderen.

Die physiologisch basierten Pharmakokinetikmodelle (PBPK) verwenden mathematische Beschreibungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen zur quantitativen Erfassung der Zielgewebekonzentration der/des PCBs und toxischen Endpunkten zur Erleichterung des Verständnisses von Aufnahmemengen und lokalen Gewebekonzentrationen einerseits und Gewebekonzentrationen und beobachteten Veränderungen andererseits.

Die entwickelten Modelle wurden zur Beschreibung der individuellen Kinetik der Gewebeverteilung, dem Metabolismus und der Exkretion der verschiedenen PCB-Kongenere bei der Ratte, der Maus, dem Hund (Beagle) und bei Rhesusaffen formuliert, basierend auf der Annahme, dass die PCB-Aufnahme in Organe Blutstrom-abhängig erfolgt.

1.1.3 allgemeine Toxizität:

Ob und wie PCBs bestimmte Erfolgsorgane beeinflussen, hängt wesentlich vom Aufnahmepfad, vom Gehalt an von der Leber synthetisierten Lipoproteinen im Blut, den Chylomikronen, sowie vom Lipidmetabolismus im betreffenden Organ und den Gefäßendothelien ab, sowie im Wesentlichen von der Bioverfügbarkeit und letztlich der Biotransformation in der Leber (review: Safe, S.H., 1994, Brouwer et al, 1994). Auch in den Zellen der Darmmukosa kann bereits ein Phase II-Metabolismus stattfinden und PCBs können über Abtransport über den Lymphweg den hepatischen Stoffwechselfvorgängen entzogen sein.

Bei oraler Aufnahme stehen eher lymphatische Effekte im Vordergrund. Hingegen werden bei inhalativer Aufnahme über das Lungenepithel PCBs vor allem über die Lipoproteine sehr geringer Dichte und geringer Dichte (VLDL und LDL) systemisch im gesamten Organismus verteilt und von fast allen Körperzellen über APO-Protein-B-100-Rezeptoren aufgenommen. Die so aufgenommenen Fette werden lysosomal verstoffwechselt (Karlson, 1998).

Krankheitsbilder auf der Basis von PCB-Exposition sind vor allem Chlorakne des Hautepithels, Organ- und Extremitätenschmerzen, Appetitlosigkeit sowie neuronal bedingte Ausfallerscheinungen und Kopfschmerzen.

Körpergewicht:

Bei Mäusen führt eine inhalative Belastung mit 5.4 mg/m³ Aroclor 1254 über 121 Tage bzw. 1.5mg/m³ über 213 Tage (*Treon 1956*) zu einer Verringerung des Körpergewichts, nicht jedoch bei einer Expositionsdauer von weniger als 24 Tagen mit entsprechenden Dosen.

Beim Menschen führt eine inhalative PCB-Aufnahme zwischen 1-120µg/m³ Aroclor 1260 nach *Fishbein et al 1979* bei 20% der exponierten Personen zur Gewichtsabnahme infolge Appetitlosigkeit und Schmerzen.

Lethalität, Kanzerogenität, Enzyminduktion und Organpathologie:

Die Werte lethaler PCB-Dosen bei Versuchstieren sind abhängig vom Aufnahmepfad, der PCB-Gemischzusammensetzung, der Expositionsmenge, Expositionsdauer und Spezies. Die hier aufgeführten Angaben sind daher ungefähre Anhaltspunkte.

Während TCDD bereits akut in geringen Dosen bei Mäusen zum 'wasting-syndrome' mit Gewichtsverlust, Verlust des adipösen Gewebes und schwerer Leberschädigung führt, ist wegen ausgeprägter Immuntoxizität der Aroclore 1016 und 1042 vor allem bei Mäusen eine erhöhte Letalität infolge von vermehrten bakteriellen Sekundärinfektionen von Bedeutung.

Bei der TCDD- Lethalität ist endogen produziertes TNF-α, offensichtlich als Reaktion infolge von Translokation von Gram-negativen Bakterien aus dem Verdauungstrakt und verringerter Entfernung zirkulierenden Lipopolysaccharids, die Hauptursache des massiven Leberschadens (Schümann, J. und Tiegs, G., 1999), wie im Tiermodell mit àTNF-Antikörpern gezeigt wurde.

<i>LD₅₀-Werte:</i>	<i>Maus:</i>	<i>Kaninchen/Ratte:</i>	<i>Primaten*/Mensch:</i>	<i>Meerschweinchen/ Nerz**:</i>
<i>dermal:</i>	2.27mg/kg Aroclor 1254 nude	1.2 bis 3mg/kg Aroclore 1242, 1248, 1221, 1260	unbekannt	unbekannt
<i>inhalativ:</i>	> 8.6mg/m ³ (1242/ 1254, 24 Tage)	> 8.6mg/m ³	unbekannt	> 8.6mg/m ³ (24 Tage)
<i>orale Aufnahme:</i>	130mg/kg/Tag (Aroclor 1254, 2Wochen)	1-1.2mg/kg (Aroclor 1254) (<30 Tage)	4mg/kg/Tag* (1248, 2-3 Monate)#	750mg/kg** (Aroclore 1221) 4g/kg** (1254 >3g/kg** (1242)
<i>maternal:</i>		0.064-1µg/kg/ Tag(TCDD!)		

LD₅₀-Werte nach Einzeldosen werden für keinen Expositionsweg, außer akut oral bei Ratte und Nerz (#) angegeben.

Für die akute orale PCB-Exposition bis 14 Tage liegen gemischunabhängig die LD₅₀-Werte, die nur in wenigen Studien angegeben werden für Maus, Ratte, Nerz und Meerschweinchen im Bereich von 100-10000mg/kg/Tag.

Histopathologische Befunde oder systemische Organschädigungen wurden bei Maus und Ratte bei Dosen von 0.1-100mg/kg/Tag vorallem bei koplanaren PCBs in Bezug auf die Leber, das endokrine System und Körpergewicht, lokale nach orthochlorierten, nicht-koplanaren in Bezug auf Nervensystem, Immunsystem und Reproduktions/ Entwicklungsparameter gefunden. Dabei scheinen bestimmte Entwicklungsfenster eine wichtige Rolle zu spielen (toxikological profile for PCBs, Safe und Brouwer et al.)

Bei längeren Expositionszeiten sind die Lowest-observed-adverse-effect-Level (d.h. die Konzentration eines Stoffes, die gerade noch zu keinem beobachtbaren negativen Effekt führt) generell eine Zehner- bis Hunderterpotenz darunter und variieren speziesabhängig und Gemisch-abhängig. Ursachen der erhöhten Versuchstiersterblichkeit werden nirgends erwähnt.

Obwohl eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu den polychlorierten Dibenzodioxinen und Dibenzofuranen besteht, ist bislang wenig über kanzerogene Wirkung von Polychlorierten Biphenylen bekannt.

Mechanistisch unterscheiden sich koplanare und non-koplanare Polychlorierte Biphenyle hinsichtlich ihres genotoxischen Potentials, der Beeinflussung neurologischer Parameter und veränderter Signaltransduktion auf zellulärer Ebene:

Vorallem Tetra- und höherchlorierte koplanare PCB-Kongenere besitzen eine östrogen-ähnliche Aktivität. Durch Bindung an den zytosolischen Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor findet sich eine Dioxin-ähnliche Modifikation des Zellzyklus als molekulare Mimikry auf der Ebene der Transskriptionskontrolle in fast allen Organen mit diesem Rezeptor (Safe, 1994, Brouwer et al. 1995, Connor et al., 1997).

Tetra- und höherchlorierte planare PCBs zeigen keinen Phenobarbital-ähnlichen Mechanismus ('PB-Type-inducer').

Desweiteren besitzen sie zumindest ein neurotoxisches Potential (Tilson/ Kodavanti, 1997).

Einige orthochlorierte PCB-Kongenere werden als ‚Phenobarbital-Typ-Induzierer‘ bezeichnet, wobei die aktivsten Kongenere mit zwei ortho- und zwei para-Substituenten sind.

Das bedeutet, dass diese PCB-Kongenere eine Phenobarbital-ähnliche Aktivität aufweisen, beruhend auf dessen Fähigkeit, in der Leber ein bestimmtes Spektrum an Cytochromen zu induzieren. Betroffen sind vorallem Monooxygenasen vom gemischten Typ und CYP2B1 und CYP2B2. Hier steht die Induktion von Monooxygenasen in der Leber (Cyt P 448, nach neuerer Nomenklatur Cyt P 450 1A1 und 1A2) im Vordergrund.

Die Einteilung in die 27 Cytochromfamilien erfolgt nach der Aminosäuresequenz. Funktionell sind die Cytochromklassen 1 bis 4 an der Verstoffwechslung von Xenobiotika beteiligt, die der

Klassen 5 bis 27 an der endogener Substrate.

Viele dieser PB-Typ-PCBs induzieren außerdem CYP3A-Isoformen, die physiologisch unter der Kontrolle von Glucocorticoiden stehen. Die Induktion dieser Cytochrome wird durch Dexamethason inhibiert (das heißt, sie werden über einen NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionsweg induziert).

Beispiele dafür sind: 2,2',4,4',5,5' Hexachlorphenol und 2,2',4,4' Tetrachlorbiphenyl in der Rattenleber.

Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien zur Folge haben viele verschieden-chlorierte PCBs diese PB-Typ-Aktivität. Verschiedene Tri- und Tetra-orthosubstituierte Kongenere induzieren die Benzphetamin-N-Demethylase (in kultivierten Hühnerembryo-Hepatozyten), auch EROD-Aktivität und Akkumulation von Uroporphyrin in höheren Konzentrationen (*Rodman et al.*, Letcher, R.J. et al., 1999).

Außerdem beeinflussen einige Kongenere die Aromatase-Aktivität (Drenth, H.J. et al., 1998), die aus zwei Systemen, einem Cytochrom (CYP19) und einem Flavoprotein (NADPH-Reduktase, überträgt Reduktionsäquivalente auf Cytochrom P450-Enzyme der ER-Membran) besteht. Beispiel dafür ist das Cytochrom P450 1A1, das AH-Rezeptor vermittelt induziert wird und dessen Funktion in Humanplazenta vor allem darin besteht, östrogene Steroide zu übertragen oder weiterzuleiten. Funktionell wird dafür der Aromatase-Enzymkomplex benötigt, der außerdem in verschiedenen anderen Geweben wie Ovar, Testis, im Fettgewebe und verschiedenen Gehirnregionen exprimiert wird. Die Funktion der Umsetzung von Androgenen in Östrogene und deren Rolle bei der sexuellen Differenzierung und Reproduktion bedingen letztlich eine mögliche Rolle der PCBs als endokrine Disruptoren.

Gezeigt wurde dies unter anderem an einer humanen choriokarzinom-Zelllinie, JEG-3.

Für TCDD und PCB 126, ein koplanares Pentachlorbiphenyl (3,3',4,4',5 PCB), fand sich in diesem experimentellen in vitro-Modell jeweils eine starke, konzentrationsabhängige Zunahme der Ethoxyresorufin-Verstoffwechslung (EROD-Aktivität). Die EC_{50} -Werten lagen bei 48nM für PCB 126 beziehungsweise 20nM für TCDD in Abhängigkeit bei 18h Inkubationszeit bei Serum-haltigem Kulturmedium. Im selben Konzentrationsbereich (75nM für PCB 126 und 48nM für TCDD) wird die Aromataseaktivität –vermutlich indirekt- durch diese Komponenten gehemmt.

Erstaunlicherweise wurden diese Effekte für zwei technische Gemische, Aroclor 1016 (bis 1 μ M) und ein Toxaphen-Gemisch (Camphelcor, bis 3 μ M) nicht gefunden, was auf den Gehalt an niederchlorierten PCBs ohne AH-Rezeptor-Aktivität zurückgeführt wird.

Allerdings waren diese Effekte in Mikrosomen aus Humanplazenta mit bekannter hoher Aromatase-Aktivität nicht beobachtbar.

Eine Tumor-Promoter-Aktivität ist bislang für 2,2',5,5' TCB und 2,2',4,5'TCB, sowie für 2,2',4,4',5,5' Hexachlor-Biphenyl beschrieben worden, die eine PB-ähnliche Aktivität induzieren und auch die Bildung von enzymveränderten präneoplastischen focal-Läsionen in Nagern fördern.

Die meisten organpathologischen Befunde gehen zurück auf Arbeitsplatz-bedingte Expositionen gegenüber Substanzgemischen über relativ lange Zeiträume.

Die hier aufgeführten Humandaten zur Exposition entstammen dem toxicological profile of polychlorinated biphenyls, U.S.department of health and human services, pp. 15-272, 1999. Die Autoren der entsprechenden Sekundärliteratur sind, sofern dieser Quelle entnommen, *kursiv* dargestellt.

Aufnahmepfade:

Letale Dosen bei Menschen sind nicht beschrieben, da kaum zwischen akut toxischen Mengen und Sekundärerkrankungen aufgrund Langzeitexpositionen unterschieden werden kann.

dermal:

Nach dermalem PCB-Kontakt beim Menschen stehen vor allem Chlorakne und Hautrötungen, sowie Keratinplaques und Zysten bei 0.1 mg/m³ über 1.2 Jahre bei verschiedenen Aroclor-Verbindungen (aus: toxicological profile of polychlorinated biphenyls, U.S.department of health and human services, pp. 15-272, 1999) sowie Pigmentierungsstörungen der Haut und Nägel, sowie Entzündungssymptome im Vordergrund.

inhalativ:

Bei Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen und Mäusen sind 8.6 mg/m³ Aroclor 1242 und 1254 über 24 Tage nicht letal.

orale Aufnahme:

LD₅₀-Werte für verschiedene Aroclore variieren speziesspezifisch von 130 mg/kg/Tag in Mäusen (Aroclor 1254) über 2 Wochen bis 4 mg/kg/Tag Aroclor 1248 in nichtmenschlichen Primaten über 2-3 Monate.

1.1.4 Spezielle Toxizität und Organpathologie:

kardiovaskuläre Erkrankungen:

Nach einer retrospektiven Kohortenstudie in einer schwedischen Kondensatorfabrik in einer Studie von *Gustavson und Hogsted 1997* zeigte sich eine signifikant gestiegene Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen bei einer erhöhten Expositionsdauer über mehr als fünf Jahre mit einer Latenzzeit von zehn Jahren. Serum-PCB-Level sind signifikant mit Zunahme des systolischen und diastolischen Blutdruck assoziiert (NOAEL < 10 ppb).

Bei Ratten wurden histopathologische Myokard-Effekte bei 50ppm und Pericardialödeme bei Rhesusaffen nach 12 mg/kg/Tag Aroclor 1248 über 3 Monate festgestellt.

gastrointestinale Effekte:

Nach einer Studie von *Fischbein 1979* klagten etwa 20% aller PCB geschädigten Personen über Appetitlosigkeit, Anorexie, weisen Gewichtsverlust auf, Erbrechen oder haben Schmerzen im Abdominalbereich nach Aroclor 1260 zwischen 1µg bis 120µg/m³. Im Zusammenhang mit PCB-Exposition auftretende Leber-, Gallenblasen - oder Gallenblasenleiter-Karzinome konnten nicht eindeutig der Exposition zugeordnet werden.

Gastrointestinale Ulcera fanden sich bei mit 100 mg/kg/Tag behandelten Hausschweinen Aroclor 1254 über 11 Tage, ähnlich wie bei nichthumanen Primaten (Rhesusaffen). Gastritis mit Hypertrophie und Hyperplasie der Magenschleimhaut bei Aroclor 1242 war bei diesen Tieren nach 1.3 mg/kg/Tag Aroclor 1248 über 2 Monate zu beobachten.

Lebereffekte:

Dickdarmschmerzen und Kopfschmerzen, sowie Intoleranz für fettiges Essen nach Mahlzeiten (*Maroni et al 1981*) wurden nach Topyralene 3010/Apirolio 0.048 bis 0.275mg/m³ über einen durchschnittlichen Zeitraum von 12 Jahren mit einem Chloridgehalt von 42 % beobachtet.

Die Zunahme der Level von Leberleitenzymen (Gamma-GT, ALT, AP und LDH), die auf eine erhebliche Schädigung des Lebergewebes hindeuten und generell in der Leberdiagnostik Anwendung finden, korrelieren mit Serum-PCB-Gehalten vorallem nach Aroclor 1260, bei höherchlorierten PCB-Gemischen (*beschrieben von Chase 1982, Emmett 1988b, Fishbein 1985/1979, Maroni 1981*).

Asymptotische Hepatomegalie fand man in 20% der exponierten Fälle nach Blut-PCB-Werten mit 1.32 µg/kg, über 12 Jahre.

Leber-regulierte Serumlipide, Triglyceride und Cholesterol sowie Serum Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT), Albumin und Globulin bei über 17 Jahre exponierten Arbeitern zeigten eine deutliche Zunahme (*Lawton et al 1985*), 0.69mg/m³ (0.2-2mg), sowie Cholesterolgehalte, Triglyceride, sowie die Lipoproteinfraktion des Blutes der HDL, VLDL und LDL (high density, very

low density, low density lipoproteins, d.i. Lipoproteine mit hoher, sehr geringer oder geringer Dichte) mit $> 0.012 \text{ mg/m}^3$ nach Aroclor 1260 über drei-einviertel Jahre und konnten positiv korreliert werden mit den PCB-Gehalten im Serum (*Baker 1980, Chaes 1982, Emmett 1985 u.a.*).

Im Rahmen der hier erwähnten retrospektiven Kohortenstudien wurde in der Regel nicht auf zusätzliche Expositions- und Risikofaktoren (Confounder) eingegangen.

Signifikant positive Korrelationen fanden sich für Serumalbumin, Totalbilirubin, β -Glucuronidase und negativen Korrelationen mit AST mit Serum-PCB-Leveln (*Steinberg et. al.1986, Anwohner einer Kondensatorfabrik*).

Ähnliche Lebereffekte wurden speziesunabhängig in Tierversuchen beschrieben: hepatische mikrosomale Enzyminduktion, Leberleitenzymanstieg im Blut, Lebervergrößerung, Fettablagerung, Fibrose und Nekrose (Brouwer et al., 1994 und 1995).

Hepatomegalie, Fettleber und Prophyrie gehen häufig einher mit Expositionen gegenüber Arocloren 1232, 1248, 1254 und 1260, den häufigsten in den Vereinigten Staaten verwendeten Gemischen.

Abhängig von der Expositionsmenge sind die Alanin-Aminotransferase gestört: 1232, 1248, 1254, 1260. Nach 1242 findet sich ein deutlicher Anstieg der Coproporphyrine im Urin. Nach den Unfällen in Japan (Yusho) und Taiwan (YuCheng) 1968 und 1979 fand sich ebenfalls eine erhöhte Prophyrie-Ausscheidung und ein Anstieg der δ -Aminolävulinsäure, der Grundsynthesestoff der Prophyrie.

Im Antipyrin-Leberfunktionsstest (*Alvares et al 1977, Emmett 1988*) zeigt sich eine geringere Antipyrin-clearance bei Blutproben von Arbeitern, die 9 Jahre gegenüber Aroclor 1260 exponiert waren.

Hinweise für Induktion mikrosomaler Enzyme sind 10.8 vs. 15.6 Stunden Halbwertszeit, sowie ein Anstieg der Porphyrinexkretion im Urin (12 Jahre Exposition, *Colombi 1982*), 1254 bis 17 Jahre, $0.048\text{-}0.275\text{mg/m}^3$ Pyralene 3010, einem PCB-Gemisch, das nach amerikanischen Bewertungsmethoden auch schlicht nach dem Gesamtchloridgehalt beurteilt wird (hier 42%).

Histopathologische Leberbefunde bei 1.5mg/m^3 Aroclor 1254 in Ratten, Mäusen, Meerschweinchen zeigen speziesübergreifend, bei Kaninchen über 213 Tage Vakuolisierung, einen erhöhten Fettgehalt (Metamorphose) und degenerative Läsionen.

hämatologische Erkrankungen:

Nach *Lawton et al (1985)* zeigten Kondensator-Fabrikarbeiter, die arbeitsbedingt Aroclor 1254, 1242, 1016 über 17 Jahre ausgesetzt waren eine leichte Abnahme der Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten, Zunahme der Lymphozyten, Monozyten und Eosinophilen Granulozyten, während Hämatokrit, Hämoglobin, weiße Blutzellen und Erythrozyten Normalwerte aufwiesen, aber in Tierversuchen hingegen Erythrozyten und Hämoglobingehalt nach 120 bzw. 121 Tagen Exposition zunahmen (Kaninchen, Meerschweinchen, Exposition über Atemluft, 5.4 mg/m^3). Über hämatologische Effekte nach oraler PCB-Aufnahme liegen keine Humanstudien vor.

Bei Affen konnte nach Aroclor 1248 und 1254 (4 mg/kg/Tag) in Mittel- und Langzeitstudien eine Anämie mit geringerem Hämoglobingehalt der Erythrozyten, einem verringerten Hämatokrit, einer Abnahme der Erythrozytenzahl und Vorläuferzellen von Leukozyten im Knochenmark festgestellt werden. Zirkulierende Neutrophile waren erhöht, Lymphozyten hingegen verringert. Der NOAEL (no observed adverse effect level) bei den Rhesusaffen lag bei $< 0.08\text{mg/kg/Tag}$ für Aroclor 1254 über 72 Monate. Offensichtlich gehen die hämatologischen Befunde zurück auf einerseits eine gestörte Hämatopoese und eine verringerte Hämoglobinsynthese der Leber (über Porphyrurie) andererseits. Inwieweit hier Kolonie-stimulierende Faktoren eine Rolle spielen, wurde nirgends erwähnt.

Skelett~Muskelerkrankungen:

Gelenkschmerzen traten bei 11% von gegenüber $0.007\text{-}11\text{mg/m}^3$ exponierten Kondensatorarbeitern auf mit einer höheren Prävalenz bei Frauen (15.2% vs. 7.7% bei Männern), sowie Muskelschmerzen (*Fishbein et al., 1979*).

Gesteigertes Femur-Wachstum konnte bei jungen Ratten (28 Tage, Gavage) Aroclor 1254 $\geq 25\text{mg/kg/Tag}$ beobachtet werden (*Andrews 1989*).

Nierenerkrankungen:

Die Niere ist weniger empfindlich gegenüber PCB-Exposition. Bei Ratten wurde eine leichte Degeneration der Nierentubuli (1.5mg/m^3 , Aroclor 1254 über 213 Tage) beschrieben (*Treon 1956*).

Lunge:

Nach chronischer Exposition > 5 Jahre sind Störungen des oberen Atmemtraktes oder auftretende Verengungsgefühle bis zu 11mg/m^3 oder Brustschmerzen bei bis zu $1.2\ \mu\text{g/m}^3$ nach 3.75 Jahren Exposition beschrieben, sowie Störungen der Lungenfunktion bei 80% exponierter Arbeiter mit einem gesteigerten FEV1/FVC- Quotienten (erzwungenes Ausatemvolumen/ erzwungene Vitalcapazität), nach Aroclor 1260, unabhängig ob Raucher oder Nicht-Raucher).

Bestimmte Methylsulfonyl-Derivate der PCBs, dabei vor allem die 4-Methyl-Sulfonyl-Derivat, werden von den Clarazellen der Lunge hochspezifisch zurückgehalten.

Die Löslichkeit der PCBs im Blut und damit der Abtransport aus der Lunge ist, neben der Abatmung, eine Funktion des Blutlipidgehaltes.

Augeneffekte:

Augenirritationen und Lidbrennen treten auf bei einer Exposition bis zu $2.2\ \text{mg/m}^3$ über mehr 3 Jahre, desweiteren sind in 13% der Fälle Ödeme des oberen Augenlids und eine Vergrößerung der Tränendrüsen bei $0.007\text{-}11\text{mg/m}^3$ über mehr als 5 Jahre beschrieben (*Fischbein 1985*).

endokrines System:

Nach *Emmett et al. (1988)* führt eine Exposition gegenüber Aroclor 1260 exponiert über 4 Jahre [0.00001- 0.012 mg/m³] zu einer Serum-Thyroxin (T₄)-Abnahme, was zumindest im Widerspruch steht mit Beobachtungen der spezifischen Retention einiger PCB-Metabolite durch Thyroxine, und zur Zunahme der 17-Hydroxycorticosteroide im Urin bei Arbeitern, vorallem nach höherchlorierten Kongeneren.

Verschiedene PCB-Gemische führen speziesspezifisch auch zu einer Thymusatrophie und zu einer Dysregulation von Jodthyroninen und -thyroxinen, zu verändertem Hormonhaushalt und Einbau von Calcium in die Skelettknochen nach Clophen A60, Aroclor 1260 beim Meerschweinchen und 1254 in der Ratte und beim Yorkshireschwein (toxicological profile for polychlorinated biphenyls, U.S. Department of health human services, 1999, Kremer et al., 1994, Kremer, Lai, Esser, 1995).

Nach (*Gerhard et al. 1998*) korreliert ein verkürzter Östrus und eine erhöhte Fehlgeburtsrate bei Frauen mit PCB 101-180 Leveln im Blut.

Störung des endokrinen Pankreas und potentielle Beteiligung von PCBs als möglicher Auslöser des juvenilen Diabetes werden diskutiert.

Störungen der Katecholaminsekretion der chromaffinen Medulla der Nebenniere werden im Abschnitt Neurotoxische Effekte besprochen, Beeinflussung hormonell-sekretorischer Vorgänge des Hirnstamms ebenfalls dort.

Neurotoxische Effekte:

Für Tetrachlor-Biphenyle sind starke neurotoxische Effekte wie zentralnervöse Funktionsstörungen, Dopaminsynthesehemmung, gesteigerte Katecholaminsekretion bei chromaffinen Zellen, Phospholipase C- und Proteinkinase C- Aktivierung (PCB 47, nicht aber PCB 77), IP₃-Anstieg, *intrazelluläre* Calciumfreisetzung und sekundär die Aktivierung von Calcium-release-activated channels (CRAC) beschrieben worden.

Aroclor 1016 führt beim Nicht-Menschenaffen *Macaca nemestrina* zur Verringerung der Dopaminlevel in Caudatus, Hypothalamus, Substantia nigra und Putamen. Aus diesen Hirnregionen wurden drei Kongenere, 2,4,4' Trichloro-Biphenyl, 2,2',4,4' Tetrachloro-Biphenyl und 2,2'5,2',4,4' Tetrachloro-Biphenyl isoliert. Diese sind in anderen Geweben persistent und stehen damit in der Diskussion als Induzierer des sekundären Parkinsonismus.

2,2',4,4' PCB (PCB 47) führt in Sprague-Dawley-Ratten bei perinataler Exposition (Schwangerschaft bis zum Postnatalen Tag 6) zur Verringerung der Gehirn-Dopamin-Konzentration.

Diese orthochlorierten Kongenere führen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Dopaminlevel in PC12-Phäochromocytomzellen und in nicht-humanen Primaten bei einer Belastung mit den Gemischen Aroclor 1016 und 1260 im Nukleus Caudatus des Hypothalamus (Angus, G.R., et al. 1996) bei einer Exposition über 20 Wochen mit 3.2mg/kg/Tag.

Die Aroclore 1254 und 1260 hingegen führen zu einer Verringerung der Dopaminlevel und 5-Hydroxytryptamin bei der Ratte (Brouwer et al., 1995).

Die Mechanismen sind weitgehend unbekannt, da vor allem von der Anwendung her kommend mit Substanzgemischen (Aroclor 1254 u.a.) gearbeitet wurde.

In erster Linie handelt es sich aber nicht um eine Modifikation spannungsgesteuerter Calciumkanäle und somit sekundär um eine Störung der Dopaminfreisetzung, sondern offensichtlich um biochemische Veränderungen in der Dopaminsynthese einerseits und zellulären Untergang dopaminergener Neurone andererseits (Messeri, M.D., I, 1997).

Die zelluläre Energiebereitstellung, die unter funktionellen Aspekten ebenfalls für Neurone ausgesprochen bedeutsam ist, wird durch diortho-chlorierte PCB-Kongeneren [2,2',3,3' (PCB 40) 2,2',4,4' (PCB 47) und 2,2',5,5' (PCB 52)] auf der Ebene der oxidativen Phosphorylierung inhibiert, interessanter Weise aber nicht durch das tetraortho-chlorierte 2,2',6,6' PCB (PCB 54) oder das koplanare 3,3',4,4' PCB (Tilson et al. 1997).

In Nagerstudien konnte gezeigt werden, dass Aroclore, speziell 1254 bei 1mg/kg/Tag bei Ratten über 56 Tage zu einer drastischen Reduktion der Tyrosinhydroxylase-Aktivität. Die Zahl Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone der Substantia nigra ist bei Wistar-Ratten bei 30mg/kg/Tag bei perinataler (Schwangerschaftstag 8 bis zur Geburt) und adulter Exposition (postnataler Tag 300) um 46-50% reduziert. Die -vermutlich indirekte- Inhibition der Tyrosin-Hydroxylase wurde gezeigt für Aroclor 1254 und 2,2' Dichlorbiphenyl an PC 12- bzw. N115-Zellen (Tilson et al., 1997) resultierend in geringeren Dopaminleveln.

Adulte Ratten sind unempfindlich gegenüber Exposition mit koplanaren PCBs (PCB 77: 3,3',4,4' und PCB 126: 3,3',4,4',5) in Bezug auf Dopamingehalte.

Bei 100-300 ppm Aroclor 1016 perinatal exponierten Wistar-Ratten (Schwangerschaftstag 8 bis Postnataltag 90) sind sogar die Level biogener Amine erhöht.

In granulären Zellen bei der Ratte konnte ebenfalls stereospezifisch für ortho-chlorierte PCBs eine Beeinflussung des intrazellulären Calciumlevels durch Inhibition der Calcium-Sequestrierung gezeigt werden. Die Aufnahme eines $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Isotops in Mikrosomen und Mitochondrien ist nach 30- respektive 50 μM PCB gestört. Ein erhöhter Calciumrelease nach 2,2' DCB in cerebellären Mikrosomen sowie eine gesteigerte Calcium-abhängige PKC-Translokation ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$) und Phosphoinositid-Hydrolyse konnten gezeigt werden, sowie deren Zeitverlauf und Konzentrations-Abhängigkeit von der PCB-Dosis, (Mundy, W., Kodavanti, P.R.S. et al. 1999), während die nicht-ortho-chlorierte PCBs (4,4' Dichlor-Biphenyl und 3,3',4,4',5-Pentachlor-Biphenyl) ohne Effekt blieben.

Die Mobilisierung von Calcium über den Ryanodinrezeptor (Wong/ Pessah 1996, Voie/ Fonum, 1998, Shafer, Kodavanti et al. 1996, Mundy, Kodavanti et al, 1999, Hanneman et al. , 1996) ist in mehreren zellulären Systemen demonstriert worden.

Im Hippocampus der Ratte ist für Dioxin ein über einen Konzentrationsbereich von 10 bis 100nM L-Typ-Calciumkanal getragener, Dosis-abhängiger schneller Calciumeinstrom gezeigt worden, während ein orthochloriertes PCB, 2,2',5,5' ohne Effekt blieb.

Für einige orthochlorierte PCB-Kongenere sind im Nagermodell motorische Störungen mit Verhaltensauffälligkeiten, das sogenannte ‚spinning syndrome‘, das auf neuromuskuläre Änderungen, vorallem der Funktion der muscarinischen Rezeptoren zurückgeht und neuromuskuläre Änderungen beschrieben worden. Dabei kommt es durch die Kongenere 2,4,4' TriCB, 2,2',4,4' TCB und 2,2',5,5' TCB (aus den Hirnregionen isoliert, auch in anderen Geweben persistent) zu Änderungen an den muskarinischen Synapsen auf der Ebene der Rezeptoren. Diese Kongenere führen unter anderem auch zur Abnahme der Dopaminlevel in PC 12 Zellen (Brouwer et al., 1195, Angus, G.R., Contreras, M.L., 1996, Tilson et al.).

Hervorgerufene Verhaltensdefizienzen sind unter anderem auch für das PCB 77 (3,3',4,4'TCB) beschrieben. Dieses koplanare Kongener ist neurotoxisch und führt zu neuronal verursachten Verhaltensänderungen: Long-Evans-Ratten, die maternal mit PCB 77 (3,3',4,4'TCB, 0.5mg und 1.5mg/kg/Tag) und PCB 47 (2,2',4,4' TCB, 1mg/kg/Tag) und einer Kombination aus beiden maternal während der Organogenese und Neurogenese der Embryonen belastet wurden, zeigen nach hohen Dosen PCB 77 langanhaltende Verhaltensdefizienzen im Offenfeld (Postnataler Tag 18 und 70(!)), einen Anstieg der motorischen Aktivität im selben Test (PND 340, nach beiden Einzelkongeneren und der Kombination) und im Catalepsietest höhere Latenzzeiten (nach dem selektiven Dopamin-D2-Rezeptor-Blocker Haloperidol, PND 100 für PCB 77).

Die im Verlauf der Versuchsdauer bestimmten PCB-Akkumulationswerte im Fettgewebe und im Gehirn zeigen ein 60-100 fach höhere Akkumulation im Fettgewebe als im Gehirn, während das orthochlorierte PCB 47 15-30 mal mehr während der Tragzeit akkumuliert, da es weniger schnell verstoffwechselt wird. Außerdem werden die Nachkommen über die Milch (über die Mobilisierung von Fett) stärker mit PCB 47 belastet (Hany et al, 1999).

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Beschreibung neurotoxikologischer Befunde nach PCB-Intoxikation sind Beeinträchtigungen in der Zusammensetzung der Sphingolipide, Sphingomyeline (Nervenzellen: Myelinscheide) und der Glykosphingolipide (graue Hirnsubstanz).

Am Menschen werden psychomotorische Defizite und Gedächtnisbeeinträchtigungen bei Kindern bis zum Alter von vier Jahren beobachtet. Für die pränatale Hirnentwicklung sind PCBs besonders problematisch. Allerdings konnte bislang kein Zusammenhang mit Exposition über Muttermilch ermittelt werden (Koopmann-Esseboom, C. et al. 1997, Winneke 1995), sondern ist in erster Linie auf eine maternale Exposition über das Nabelschnurblut zurückzuführen. Unter Berücksichtigung der Confounder wurden neuronale Entwicklungsstörungen festgestellt mittels kognitiver Funktionstests oder Gesichts-Erkennungs-Erinnerungs-Tests bei Kindern bis zu 12 Monaten, sowie anderen bis 42 Monate und bei Kindern zwischen 4 und 6.5 Jahren und 6 bis 16 Jahren. Die

Bewertungen erfolgen nach Methoden der Brazelton neonatalen Verhaltens Assessment Skala, BNBAS, der Mc Carthy-Skala, dem Wechsler-Test, dem Stanford-Binet-Intelligenztest oder dem Kauffmantest durchgeführt.

Studien zur neuromotorischen und kognitiven Entwicklung aus drei Kohorten des Michigan-Seengebietes, North-Carolina und einer nach YuShen (Taiwan) an pränatal maternal belasteten Kindern geboren zwischen 1978 und 1982 im Alter von 4 bis 7 Jahren konnten in der North-Carolina-Kohorte Hyporeflexie und Hypotonie signifikant mit transplazentaler PCB-Exposition assoziiert werden, ohne dass nach dem McCarthy-Testverfahren neuromotorische Entwicklungsdefizite offenbar waren.

Die pränatal massiv durch kontaminiertes Reisöl nach YuShen belasteten Kinder mit PCB-Werten 10-20fach höher als der Hintergrundbelastung zeigten deutlich signifikante kognitive Defizite mit etwa 5 IQ-Punkten weniger. In der Michigan-Kohorte (Kinder 7 Monate bis 4 Jahre) wurden nach Konsum PCB-belasteter Fische im Nabelschnurblut und in der Muttermilch PCB-Werte bestimmt, und entsprechende Entwicklungstests bei den Kindern durchgeführt, wobei die rein maternale Exposition signifikant negativ korreliert werden konnte mit Bewertungsmaßstäben nach der McCarthy-Neuroentwicklungs-Assay-Methode, nicht aber mit der Exposition über die Muttermilch.

In einer gerade erst abgelaufenen Kohortenstudie aus drei verschiedenen Kohorten aus den Niederlanden, Düsseldorf und den Faröer-Inseln wurden in einem Zeitraum bis 42 Monate nach der Geburt PCB-Level im Serum der Mütter, im Nabelschnurblut der Neugeborenen und der Muttermilch bestimmt und korreliert für motorische und mentale Entwicklungsparameter.

Während PCB-Gehalte im Nabelschnurblut keine für motorische und mentale Entwicklung bedeutsame Größe für die Kinder darstellen, hat der PCB-Gehalt in der Muttermilch auf beide Entwicklungskategorien einen statistisch bedeutsamen negativen Einfluss ab einem Alter von 30 bis 42 Monaten (Winneke et al. 2000, in press).

Aus Tierexperimentellen Studien ist hervorgegangen, dass vorallem das Kurzzeitgedächtnis anfällig zu sein scheint gegenüber Störungen durch orthochlorierte PCBs.

In lernorientierten Modellen in Interventionsstudien sind Jungtiere vorallem pränatal über die Mutter exponiert anfällig, nicht aber nach postnataler PCB-Gabe über Muttermilch oder die Nahrung (Brouwer, Winneke et al, 1994).

Dabei sind PCB 118 (5mg/kg/d) bzw. PCB 126 (1µg/kg/d) maternal belastete Tiere ab dem postnatalen Tag 3 bis zur Entwöhnung nach 3 Wochen weniger in der Lage, visuell orientiert zu lernen.

Andere Parameter der physischen Entwicklung wie Körpergewichtszunahme, Fellentwicklung, Augenöffnung oder Reflexe wie Oberflächenrichtungreflex, Kopfhebung, Gehfähigkeit oder Griffstärke sind nicht signifikant beeinträchtigt, obschon die Tiere Hyperreaktivität zeigen.

Die neuromotorischen Defizite beruhen aber nicht, wie *Goldey et al. 1995* zeigen konnten, auf einer gestörten Schilddrüsenfunktion. Diese ist ihrerseits wesentlich durch das freigesetzte Trijodthyronin

(T₃) an der funktionellen Sensibilisierung von Catecholaminrezeptoren, obgleich die Typ-II-Tyrosin-5'-Dejodase im Gehirn durch die PCBs 77 (3,3',4,4') und 126 (3,3',4,4',5) (Brouwer, Winneke et al, 1995) verringert ist.

Die Calcineurinaktivität ist nur im Cerebellum weiblicher Ratten nach Aroclor 1254 um 38% bei 5 mg und 24 % bei 25 mg/kg Tag bei Belastung am Postnataltag 10 bis 16 und 31% bzw. 54% bei Belastung adulter Tiere.

Immuntoxizität:

Funktionsstörungen immunkompetenter Zellen konnten von Voie/ Fonum an humanen Granulozyten demonstriert werden. Vorallem nicht-koplanare PCBs blockieren die ATP-abhängige endoplasmatische Calciumpumpe und erhöhen den intrazellulären Calciumspiegel als wichtigen Botenstoff vieler enzymatischer Systeme. Unter anderem resultiert dieser [Ca²⁺]_i-Anstieg nach 2,2' DCB in gesteigerter Degranulierung und Superoxyd-Produktion in Neutrophilen.

Aussagen zur *Immunsuppressivität* und zur *Immuntoxizität* der Polychlorierten Biphenyle kommen in erster Linie aus in vitro- und in vivo-Studien mit Mäusen.

Nach Vorbehandlung mit den Arocloren 1042 und 1016 ist die Sterblichkeit gegenüber bakteriellen Infektionen in der Maus deutlich erhöht.

Im SRBC-Test (sheep-red-blood-cell-Immundefunktionstest) nach Milzentnahme ist die Plaque-Bildung nach Aroclor 1242 Exposition gestört sowie bei Transplantationsversuchen nach Aroclor 1016 die Abstoßung des Spenders durch die im Transplantat enthaltenen immunkompetenten Zellen verändert (graft-versus-host-Reaktion). In Milz und Thymus sind nach den Arocloren 1254 und 1260 die gamma-Globuline bei Kaninchen und Meerschweinchen verringert und im Meerschweinchen nach Clophen A 60 und Aroclor 1260 die Fähigkeit von B-Zellen, Tetanustoxin-Antikörper zu produzieren. Die meisten Aroclore stören die Antikörperproduktion der murinen B-Zellen im SRBC-Test.

Für Kaneclor 500 wurde außerdem eine gestörte T-Zell-Funktion gezeigt und bei *Rattus norvegicus* eine gestörte Funktion der Naturkillerzellen (NK-Zellen)-Aktivität nach Aroclor 1254.

Im Vergleich zum TCDD, das bei 1µg/kg bei Ratte und Maus bei perinataler Exposition die T-Zell-Differenzierung stört und zur Zunahme doppelt-negativer T-Zell-Klone (CD 4⁻/CD 8⁺) führt, führen PCBs und polychlorierte Dibenzodioxine und -furane zur Thymusatrophie, zur Reduktion der Prothymozyten-Aktivität in der fötalen Leber und zur verringerten Repopulationskapazität. Über die Mechanismen ist wenig bekannt.

Aus Humanstudien einer holländischen PCB- und Dioxinstudie wurden Auswirkungen von pränataler PCB-, PCDD- und PCDF-Exposition bei Säuglingen im Alter von drei Monaten bekannt, bei denen die Monozyten und Granulozytenzahlen im Blut verringert waren, andererseits aber im Alter von 1.5 Jahren bestimmte T-Zellen erhöht (Umweltbundesamt, Bundesgesundheitsbl. 42, 1999).

Reproduktionstoxikologische Befunde:

Einige Befunde existieren über eine Korrelation von PCB-Exposition und Fertilitätsveränderungen beim Menschen ('sperm-account') durch Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und Chlorbromhexane (Mc Farland et al., 1989), bzw. verkürzten Menstruationszyklus bei Frauen nach sieben Jahren monatlich einmaligem Fischkonsum (Mendola et al., 1997). Eine Gavage von 25mg/kg/Tag (Aroclor 1254) über 15 Wochen bei Ratten und Mäusen resultiert in verringerter Zahl der Seminalvesikel und Spermienzahl, 1µg/kg Tag TCDD bei Ratten führt bei perinataler Belastung und bei Belastung über die Muttermilch bis zum Postnatalen Tag 15 zu Fertilitätsstörungen (Brouwer et al.).

1.1.5 Metabolismus:

Die Metabolisierung der Polychlorierten Biphenyle erfolgt direkt oder über Arenoxyd-Intermediate zu Phenolischen Metaboliten, die weiter hydroxyliert oder zu Katecholen und phenolischen Konjugaten konjugiert werden.

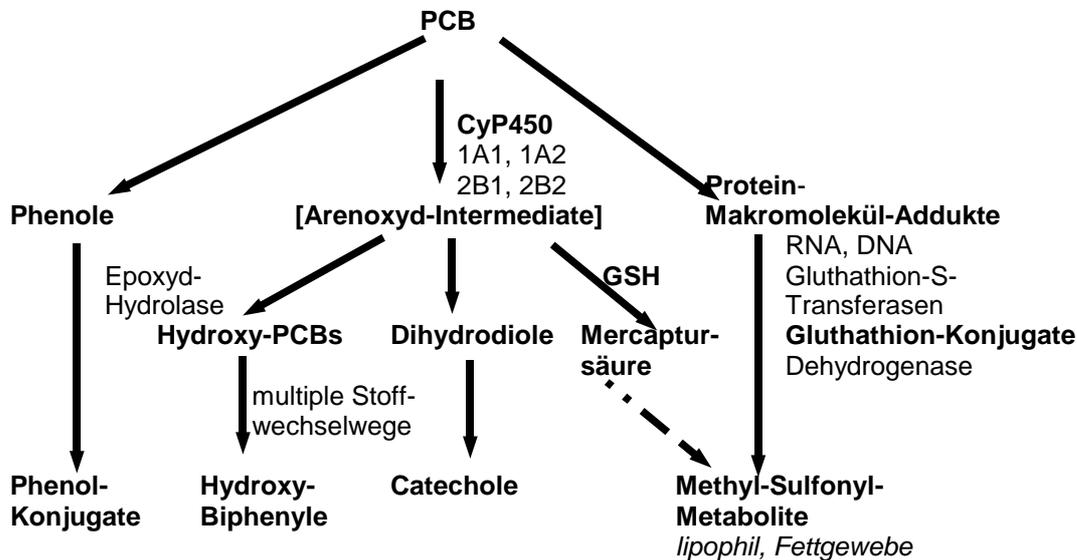


Abbildung 3: vorgeschlagene Stoffwechselwege der polychlorierten Biphenyle im Säugerorganismus (modifiziert nach G.Koss, 1997 und Safe, S.H., 1994)

Mittlerweile gilt das Hauptaugenmerk nicht mehr ausschließlich den ‚nativen‘ polychlorierten Biphenylen.

Da bestimmte PCB Kongenere mit einerseits langer Halbwertszeit und geringer Clearance und andererseits vor allem Hydroxy- und Methylsulfonyl-Metabolite in verschiedenen Humangeweben akkumulieren, ist deren toxikologisches Potential dringend klärungsbedürftig. Dementsprechend wendet man sich seit einigen Jahren auch verstärkt den Intermediaten und Stoffwechselprodukten bzw. Derivaten zu, wobei vor allem die entstehenden Dihydrodiole sowie die Hydroxy- und Dihydroxyverbindungen nach CyP450-getragener Verstoffwechslung eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

Stoffwechselprodukte der polychlorierten Biphenyle werden in umweltbelasteten marinen Säugerorganismen (graue Robbe), experimentell exponierten Ratten und im Humanblut in unterschiedlichen Mengen und Zusammensetzungen gefunden. Dabei werden aber, obschon rein mechanistisch alleine über 200 verschiedene Hydroxyformen und zusammen mit den Methylestern weit mehr Metabolite erwartet werden können, nur 13 in der Robbe oder im Humanblut und ebenfalls nur 13 OH-Metabolite im Blut experimentell 1254 exponierter Sprague-Dawley-Ratten (vorallem das PCB 153-Hydroxylierungsprodukt 4-OH-2,3,5,3',4' Pentachlorobiphenyl), nicht aber in deren Fettgeweben gefunden.

Die Konzentration eines Hydroxyprodukts, die hydroxylierte Form des chlorierten Biphenyls 105, ist wesentlich höher als die des als eines der persistentesten beschriebenen, PCB 153. Die strukturelle Ähnlichkeit der gefundenen Hydroxykongenere und die geringe Zahl der nachweisbaren Kongenere im Vergleich zu der zu erwartenden Zahl der Metabolite lassen einen spezifischen Mechanismus der Retention im Blut vermuten, möglicherweise, wie Bergmann, A. et al., 1994, vorschlugen, durch Bindung an das Thyroxin-transportierende Protein Transthyretin.

Meist sind es die 4-OH-Derivate vorallem der Penta- und höher chlorierten Biphenyle mit signifikant höheren Halbwertszeiten.

Im Blut von Robben wurden vorallem Methyl-O-Heptachlorbiphenyle nachgewiesen, ähnlich wie die im Humanblut detektierbaren, die sich hier vorallem von den Heptachlorbiphenylen 187 und 183 ableiten lassen.

Orthochlorierte PCBs aus experimentell Arochlor 1254 exponierten Ratten und auch umweltbedingt beim Seehund und im Humanblut vorkommend, sind als C 3 -chlorierte Biphenyle analytisch nachzuweisen, das heißt, sie unterliegen einer 1,2-Verschiebung eines Chloratoms in Paraposition (Bergman et al., 1994).

Zuerst in humanem Fettgewebe, Leber und Lunge nach Yusho und Yu Cheng beschrieben, wurden Methyl-Sulfonyl-Metabolite von PCBs (und von DDT, chemisch 2,2-bis-4-Chlorophenyl-1,1,1-Trichloethan) in verschiedenen Studien in Humanmilch über einen Zeitraum von 20 Jahren verfolgt. Dabei nahmen die auf im wesentlichen industrielle Verwendung zurückgehenden Belastungswerte zwischen 1972 bis 1992 von 9 ng/g Lipidgewicht auf 2 ng/g im Studienzeitraum ab. Korrelierend mit dem Total-PCB-Gehalt, wurden vorallem Penta- und Hexachlorbiphenylmetabolite gefunden. Die Methylsulfongruppen sitzen in C 3- oder C 4-Position (aus 2,5 oder/und 2,3,5-substituierten PCBs), mit unsubstituierten meta- oder Parapositionen in Nachbarschaft zu chlorierten Positionen, was die Glutathion-Konjugierung nach Cytochrom P450 abhängiger Arenoxid-Intermediatbildung erleichtert (Bergman et al., 1996). Oftmals sind die Metabolisierungsvorgänge derart schnell, dass die Ursprungskongenere in den Geweben und Proben nicht gefunden werden. Generell ist die Metabolisierung der PCBs aber starken speziesspezifischen Unterschieden unterworfen.

Die Metabolite sind mitunter wesentlich reaktiver als ihre Ursprungsverbindungen. Das gilt für einige PCB-Kongenere, die ein toxisches Potential für chromaffine Zellen darstellen (Messeri, Wiegand et al. 1997), wie auch für DDT- und PCB-Methylsulfonylderivate, die als Inhibitoren der Glucocorticoidsynthese in der Maus und auch im Menschen als in vitro Bioaktivierung beschrieben sind.

Der analytische Nachweis von PCB- und DDT-Metaboliten nach Autopsie in verschiedenen Matrices 7 verstorbener schwedischer Personen im Alter von 47 bis 80 ergibt ähnliche Werte im Fettgewebe und der Lunge, aber einen signifikant höheren Anteil der Methylsulfonyl-Metabolite in der Leber. Vorallem Penta- und Hexachlorphenol-Metabolite werden dort in höheren Konzentrationen akkumuliert, während diese Metabolite im Nicht-Itozell-Fettgewebe nicht auftauchen (Weistrand und Norén, 1997).

Die 3- oder 4-Methylsulfonyl- polychlorierten Biphenyle zeigen eine zunehmende Akkumulation in der Leber im Vergleich zum Fettgewebe für das Methylsulfonyl-2,2',3',4',5 Pentachlorobiphenyl (2.5fach), das 3-Methylsulfonyl- 2,2',3',4',5,6 (250 fach) und das 3-Methylsulfonyl-PCB 149 (2,2',4',5,5',6, etwa 6.3 fach).

Das bedeutet, das je nach Position der Chlorierung bei vergleichbarer Substituentenzahl unterschiedliche gewebeabhängige Akkumulation stattfinden kann und ansich auf dieser Grundlage das toxikologische Potential zu bewerten ist.

Studien zur Metabolisierung bei Mikrosomen aufgereinigt aus Rattenhepatozyten einiger Beispielkongenere belegen desweiteren, dass

- (1)nach Phenobarbital-Vorbehandlung diorthosubstituierte PCB-Kongenere etwa 100x schneller metabolisiert werden als ohne Induktion (und diese auch selber P450-Monooxygenasen induzieren können)
- (2)am ortho-C-Atom praktisch nicht hydroxyliert wird
- (3)koplanare PCB-Kongenere, wie etwa das PCB 77 (3,3',4,4'Tetrachlorobiphenyl), erst nach Vorbehandlung mit 3-Methylcholanthren effizienter verstoffwechselt werden oder von der Aktivität der Ethoxyresorufin-O-de-Ethylase abhängig sind und (s. auch Abschnitt allgemeine Toxizität)
- (4)höherchlorierte PCB-Kongenere, wie das 3,3',4,4',5,5' Hexachlorobiphenyl sehr effizient die Verstoffwechselung des PCB 77 durch das beteiligte hepatische Cytochrom P450-System inhibieren können.
- (5)ohne Monooxygenase-Induktion eine Verstoffwechselung von 2,2',3,5,5',6 Hexachlorobiphenyl stattfindet, während 2,2',3,4,4',6 Hexachlorobiphenyl nicht in detektierbaren Raten abläuft. Somit ist die Umsetzung durch die beteiligten Enzymsysteme nicht nur stereospezifisch sondern *stereo-Substituenten-spezifisch*. Die Autoren (Borlakoglu et al.1990) führen dies unter anderem auf relative Ladungsverteilungen der abgehenden Chloridreste zurück, sowie weiterhin auf die durch Substitution veränderten Bindungslängen der Kohlenstoffabstände.

Die Studien zum Metabolismus verschiedener PCB-Kongenere belegen, dass ausser der sterischen Konfiguration große speziesspezifische Unterschiede in der Clearance, in vitro-Aktivierung, der Akkumulation und spezifischen Retention von Kongeneren und Metaboliten bestehen, die über den Chlorierungsgrad hinausgehend streng abhängig von der Position der Substituenten zeigen und somit in die toxikologische Bewertung mit einfließen müssen.

Eine Beurteilung von Einzelkongeneren allein nach dem Toxizitäts-Äquivalenzkonzept auf der Basis experimentell PCB-exponierter Versuchstiere ist daher nicht sinnvoll, um auf regulative Richtlinien für die Humanexposition Rückschlüsse zu erlauben.

PCBs sind nach wie vor nicht ausschließlich Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen. In letzter Zeit treten vermehrt auch immer wieder Fälle auf, bei denen aufgrund krimineller Energie in Tiermastbetrieben PCB-kontaminierte Öle offenbar 'elegant' entsorgt werden sollen und dem Tierfutter beigemischt wurden. Beispiele sind die belgischen Tierfutterskandale 1998 und 1999.

Im Folgenden werden kurz die experimentellen Systeme vorgestellt, anhand derer mechanistische Aussagen zur PCB-Wirkung auf humane zelluläre Systeme gewonnen werden sollten.

1.2 Humanmakrophagen: Schnittstelle zwischen Nerven- und Immunsystem

Das System der Granulozyten/Makrophagen stellt die erste unspezifische Barriere des Immunsystems bei der Pathogenabwehr dar. Diese Abwehr gehört zur angeborenen Immunität, ist immer vorhanden und führt, im Gegensatz zu B- und T-Zell abhängigen Reaktionen nicht zu einem immunologischen Gedächtnis.

Während die im Blut zirkulierenden Monozyten vor allem Patrouille-Funktionen beim Aufspüren von Erregern und Entzündungsherden und der akuten Erstabwehr erfüllen, haben in den Organen residente Makrophagen eher eine Funktion der 'Überwachung des immunologischen Status' im betreffenden Organ als Gewebssonden, etwa als Kupferzellen in der Leber oder Alveolarmakrophagen der Lunge.

Entwicklung aus peripheren Blutmonozyten:

Makrophagen durchlaufen bis zu ihrer Reifung als residente Gewebsmakrophagen, als die sie zwei bis drei Monate im Säugerorganismus vorliegen können, diverse Entwicklungsstadien aus den Vorläuferzellen des Knochenmarks über periphere Blutmonozyten, bevor sie in die Organe einwandern.

Im hämatopoetischen Gewebe der Plattenknochen entstehen sie als Monoblasten und verlassen als Promonozyten gemeinsam mit Granulozyten aus der Granulozyten/ Makrophagen-Kolonie bildenden Einheit (GM-CFU) mit einem relativem Anteil an den Blutgesamtzellen von etwa 1-6% beim Erwachsenen und 9% bei Kindern, bei Neugeborenen oft höher (E.Kleihauer, 1978) das Knochenmark.

Die Monozyten des Blutes patrouillieren über Stunden bis einige Tage (zwei Wochen) durch Blut und Lymphsystem.

Sie besitzen eine ausgesprochene Fähigkeit zur Pinozytose, Phagozytose von mit Antikörpern opsonisierten Mikroorganismen (oder allgemein Thymus-unabhängigen Antigenen), und zu deren Abwehr vorallem über die massive Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (den respiratorischen burst : H_2O_2 , O_2^*) und Freisetzung proinflammatorischer NO^* -Radikale.

Nach Aktivierung durch CD4-T-Zellen-über MHC-II/CD4 und weitere costimulatorische Signale, wie Interferon-g (T_H1 -Zellen) und CD40-Ligand auf T_H1 -Zellen/ CD 40 auf Makrophagen erfolgt die Aktivierung des Makrophagen, der nachfolgend Immunfunktionen verbessert wahrnehmen kann, wie etwa gesteigerte Lysosomenfunktion, Antigenpräsentation, gesteigerte Expression der für B- und T-Zellen wichtigen costimulatorischen Signale B7 und CD40. Dadurch werden native T-Zellen effektiver zur klonalen Expansion und spezifischen Immunabwehr stimuliert. Die beiden proinflammatorischen Zytokine TNF-a und IFN-g: wirken synergistisch bei der Makrophagenaktivierung, vorallem bei Induktion der Nitritoxydsynthese, die ebenfalls bei

Makrophagen ein Bauteil der Immunabwehr ist.

Eine gesteigerte IL-12-Sekretion durch den Makrophagen steuert die CD 4-T-Zelldifferenzierung zu T_{H1} -Zellen. Eine Inhibition der Makrophagenaktivierung erfolgt durch TGF- β , die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 (von T_{H2} -Zellen) oder den FAS-Liganden auf zytotoxischen T-Zellen (der Makrophagen in die Apoptose treibt).

Die virale Abwehr durch Makrophagen erfolgt durch Präsentation von Virenpeptiden über MHC-I an CD8-T-Zellen und MHC-II an CD4-T-Zellen.

Letztlich ist der Makrophage auch schlicht zur Beseitigung von organischem und anorganischem Material vorallem in der Lunge als Alveolarmakrophagen vorhanden, erfüllen dabei aber gleichzeitig wichtige immunologische Funktionen beim Anlocken anderer immunkompetenter Zellen, der Auslösung, Steuerung und Koordination der Immunabwehr.

Der Makrophagenbeitrag der spezifischen zellgebundenen Immunabwehr nach Antigenkontakt besteht vorallem zunächst in der Interleukin 2-Sekretion (als kostimulatorisches Signal im Kontext mit CD 40 zur B-Zell-Reifung und T-Zell-Reifung über MHC-II und T-Zell-Rezeptor sowie B 7/CD 28).

Makrophagen besitzen vorallem über die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin 1 eine ausgeprägte Antitumoraktivität und wandern nach Freisetzung chemotaktischer Signale in Entzündungsherde und Lymphknoten ein, wie etwa ausgelöst durch Freisetzung von MCF, dem Makrophagen Chemoattraktivem Factor von T_{H1} -Zellen und beseitigen apoptotische Zellen (vorallem nach Gewebsuntergängen oder während der Affinitätsreifung und klonalen Selektion von B-respektive T-Zellen).

Typische Makrophagen-Rezeptoren, die auch die Zellkultur charakterisieren, sind, in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstatus, dem Aufenthaltsort und dem Aktivitätszustand hervorgerufen durch vor allem das Zytokinspektrum, das von den umgebenden zellulären Systeme mitbestimmt wird:

der LPS-Rezeptor (CD 14), der Glycanrezeptor, der Mannose-Rezeptor, der scavenger-Rezeptor, sowie weitere Rezeptoren vorallem aus der Reihe der Interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM), die eine Wechselwirkung mit zellulären Adhäsionsmolekülen gestatten und die oftmals sowohl auf Makrophagen und Gefäßendothelien oder Organen nach demselben Signal hochreguliert werden, wie etwa ICAM-1 nach TNF auf Endothelzellen, CD 11c, CD 18 (LFA-1 auf Makrophagen, Endothelwechselwirkung), CD11b (= MAC 1) auf den Makrophagen. Diese dirigieren die Makrophagen zu Entzündungsherden nach *Diapedese*, also Durchtritt durch die Gefäßendothelien und sind von Bedeutung bei dem Übertritt von zirkulierenden Makrophagen aus der Lymphe in die Blutbahn.

Von den Makrophagen produzierte Zytokine und Entzündungsmediatoren sind:

Die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, sowie weitere Zytokine und Entzündungsmediatoren wie TNF- α , Prostaglandine, Leukotriene (v.a. B4), PAF (platelet activating factor), G-CSF, GM-CSF, M-CSF

(Granulozyten-, Granulozyten/Makrophagen- und Makrophagen-Colonie-stimulierender Faktor). Diese dirigieren insgesamt das System der spezifischen Immunabwehr und führen zu lokalen Blutgefäßveränderungen, vor allem auch nach TNF- α : dessen systemische Freisetzung führt zu

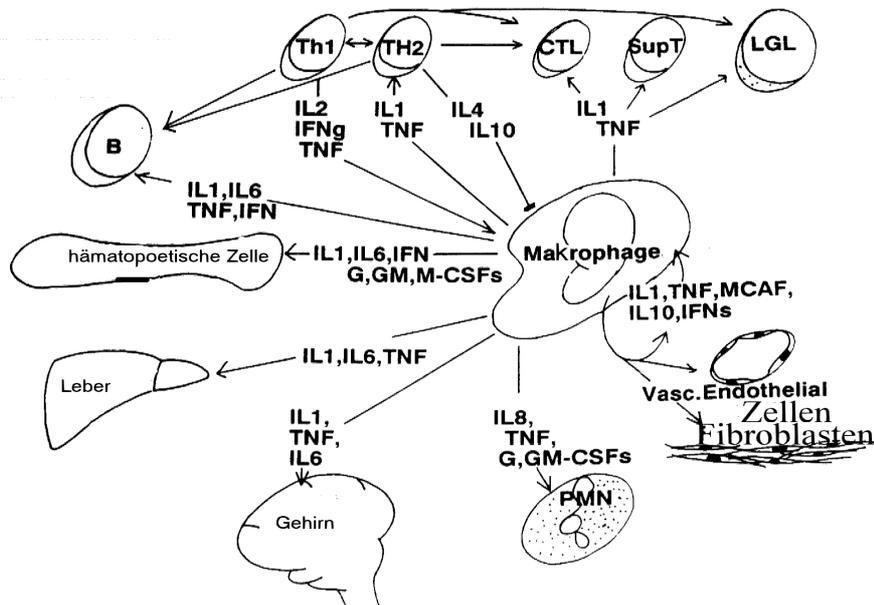


Abbildung 4: Der Makrophage im Cytokin-Netzwerk. Dargestellt sind wesentliche Zell-kommunikative Signale beim Auslösen und Steuern der Immunantwort zwischen Gehirn, Leber, strukturellen Zellen (Fibroblasten), Zellen des hämatopoetischen Systems und immunkompetenten Zellen (modifiziert nach: Nielsen et al., in: Zwilling/Eisenstein, 1994).

Abkürzungen: IL= Interleukin (1 bis 10), TNF =Tumornekrosefaktor, B = B-Lymphozyt, T_{H1} , T_{H2} = T-Helfer-Lymphozyten der T_{H1} - bzw. T_{H2} - Linie, IFN = Interferone, M-CAF = Makrophagen-Chemoattracting Faktor, PMN = Polymorphkerniger Granulozyt, SupT = Suppressor-T-Zelle, CTL = cytotoxische T-Zelle. Erklärungen: s. Text

Sepsis ('Blutvergiftung'), wenn in Organen (Leber, Lunge, Milz) freigesetzt: Gefäßerweiterung, Verlust von Blutplasma aufgrund erhöhter Permeabilität der Gefäßwände, und schließlich meist in Verbindung mit Ödembildung zum septischen Schock (Janeway,A., Travers, P., 1998).

Makrophagen spielen auch eine Rolle bei der langfristigen Immunabwehr: sie setzen endogene Pyrogene frei, sind beteiligt am Auslösen der akute-Phase-Reaktion der Leber (über die Zytokine IL-1, IL-6, TNF- α), steigern vorallem die Freisetzung des C-reaktiven Proteins (Pentraxine), welches Phosphorylcholin bestimmter Lipopolysaccharide in der Zellwand von Bakterien und Pilzen bindet, und MBL (ein mananbindendes Lektin, das normalerweise nur in geringen Mengen im Plasma nachweisbar ist).

MBL ist ein calciumabhängiges, zuckerbindendes Protein der Kollektinsuperfamilie, das als Opsonin der Bakterien für Monozyten fungiert, die, anders als Gewebsmakrophagen; nicht den Mannoserezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Diese Opsonine aktivieren einen proteolytischen Enzymkomplex des Komplementsystems, der Teil der unspezifischen Immunabwehr im Organismus ist. Akute Phase Proteine erfüllen in den ersten zwei Tagen der Infektion die Funktion von Antikörpern im Organismus.

Funktioneller Status und Aktivierung des Makrophagen:

In Abhängigkeit ihrer Entwicklungsstufe und dem Aktivitätsmuster umgebender Zellen ändert sich das Oberflächenrepertoire und der Aktivitätszustand, sowie weitere zelluläre Eigenschaften wie Adhärenz, Motilität und Wachstum während der Differenzierung der Monozyten zu (Gewebs-) Makrophagen (Illes, Norenberg, Gebicke-Haeter et al., 1996, Hara et al., 1991, Gantner et al. 1997 und 1999) in Kultur.

Während zelluläre Stammzellmarker wie das Leukozytenoberflächenantigen CD 45 und ein Oberflächenprotein myeloider Zellen, CD 13, über mehr als sechs Tage in Kultur der von Monozyten abgeleiteten Makrophagen konstant bleiben, verringert sich die Expression beispielsweise eines der Rezeptorproteine für Lipopolysaccharid, CD 14, und die Expression des Gewebekompatibilitätskomplexes II (MHC II).

Dies mündet unter anderem auch in einer Änderung des Repertoires an Ionenkanälen während der Ausdifferenzierung zu Gewebsmakrophagen oder nach Aktivierung durch verschiedene Cytokine (Kim, 1996, Nacchache, P., 1998, Nabokina, 1997):

Völlig verschiedene Signale wie M-CSF (und kurzer Intervention mit GM-CSF), Interferon-g und LPS (Lipopolysaccharid) ändern das Kaliumkanalprofil auf den Makrophagen während der Ausdifferenzierung in Kultur erheblich: die Zellen exprimieren einen K⁺-Auswärtsgleichrichter, während nicht-adhärenente Monozyten ein der adhärenente Mirkoglia des Gehirns ähnliches Muster an Kalium-Einwärtsgleichrichtern haben (die deshalb auch als ruhende Gehirnmakrophagen bezeichnet werden).

Leitfähigkeit:	Aktivierung:	Blockierbarkeit:	Spezies:	Referenz:
(a) mit nicht-selektiver Leitfähigkeit				
Kationen (unspezifisch)	Calcium, spannungsabhängig	Blei, Quecksilber, andere Schwermetalle	Ratte, Maus, Mensch	Partridge, L.D., Swandulla, D. Parekh, A. B., J.
Kationen	cAMP, cGMP, ATP ⁴⁻ , GTP ^{γ-S} , zweite Botenstoffe	steigende Magnesiumkonzentrationen	Ratte, Mensch	Partridge, L.D., Swandulla, D. und Lewis, C.E., McGee, J.O'D. (Edtrs)
Anionen	zweite Botenstoffe		Maus, Ratte, Mensch	Nuttle, L. C. and Dubyak, George R.
(b) mit selektiver Leitfähigkeit:				

Tabelle 1: Ionenkanäle bei Humanmakrophagen

Fortsetzung Tabelle 1:

<u>Kaliumkanäle:</u>				
Einwärtsgleichrichter	spannungsabhängig	Barium-, Rubidium-, Cäsiumchlorid, 4-Aminopyridin, Tetraethylammoniumchlorid	Maus, Mensch, Ratte	Eder, C.; Banati, R.B et al. Gebicke-Haerter, P.J. et al., Kettenmann, H. et al., Raivich, G., et al.
Auswärtsgleichrichter mit großer Leitfähigkeit	spannungsabhängig	Barium-, Rubidium-, Cäsiumchlorid, 4-Aminopyridin, Tetraethylammoniumchlorid	Ratte, Maus, Mensch, murine Makrophagen-Linie J774	(Illes, P. et al., Fischer, H. G. et al. Arzneimittelbrief, Eder, C., 1998),
Verzögerter Auswärtsgleichrichter	spannungsabhängig	Cäsiumchlorid, 4-Aminopyridin, Tetraethylammoniumchlorid	Mensch	Artalejo, A., Garcia, A., Neher, E.
spannungsabhängig, mit großer Leitfähigkeit	spannungsabhängig	dto.	Mensch, Maus, Ratte	Eder, Claudia, Fischer, H.- G.
Calcium-aktiviert	Calciumchelatoren: EGTA		Mensch, Maus, Ratte	Nüße, O. et al. Hara-N, Ichinose-M, Sawada-M, Maeno-T.
Calcium-release-aktiviert (CRAC)	Calcium aus intrazellulären Speichern Unterscheidung von Einstrom: auch bei hyperpolarisierenden Pulsen aktiv	Charybdotoxin, EGTA, Verapamil, Cobalt	Mensch, Maus, Ratte	Parekh und Penner, R., Ranriamampita, C. and Tsien, R., Parekh, A. B., Fleig, A., Penner, R. Holda, J. R. et al.
<u>Protonenkanäle:</u>	Calcium, spannungsabhängig	Disulfonsäure-Stilbene, (DIDS) 100µM	humane THP-1-Zellen, Mensch, Maus, Ratte	Schrentzel, J. et al.
<u>Calciumkanäle:</u>	Ligandengesteuert: ATP-aktiviert (P2), GMP-abhängig, G-Proteingekoppelte (P2Y)	Schwermetalle	Mensch, Maus, Ratte	Nuttle, Louise C. and Dubyak, George R., Naumov, Kaznachejeva, Kuryshev et al
<u>Chloridkanäle:</u>	Calcium		Humane THP-1-Zellen	Holevinsky, KO., Jow, F., Nelson, DJ.

Tabelle 1: Ionenkanäle bei Humanmakrophagen, ~Vorläuferzellen und entsprechenden Zellen anderer Spezies und Zelllinien

Somit ist auch eine Zellkultur von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen ausser biochemisch, und immunologisch auch elektrophysiologisch charakterisierbar (Perry, V. H. and Gordon, S., 1998, De Coursey et al, 1996 I und II).

1.2.1 Regulation des Calciumhaushalts des Makrophagen:

Ein wesentliches Prinzip zellulären Stoffwechsels ist es, einerseits mit Ionen-, Protonen- oder Metabolitengradienten dynamische Prozesse steuern zu können, andererseits Stoffwechselabfolgen zu kompartimentieren, also in verschiedene zelluläre Räume aufzuteilen und zu verlagern und so auf der Ebene von teilweise energieabhängigen Transportsystemen Teilschritte enzymunabhängig, aber Substrat- und Energiestatus-abhängig regulieren und zwischen anabolen und katabolen Stoffwechsellagen umschalten zu können.

Wesentliche Kompartimente zellulären Stoffwechsels sind neben dem Extrazellulärraum, dem Cytosol und dem endoplasmatischen Retikulum weitere, durch Endomembranen abgegrenzte Räume, wie das Perikaryon, die Lysosomen, der Golgiapparat und vorallem die Mitochondrien.

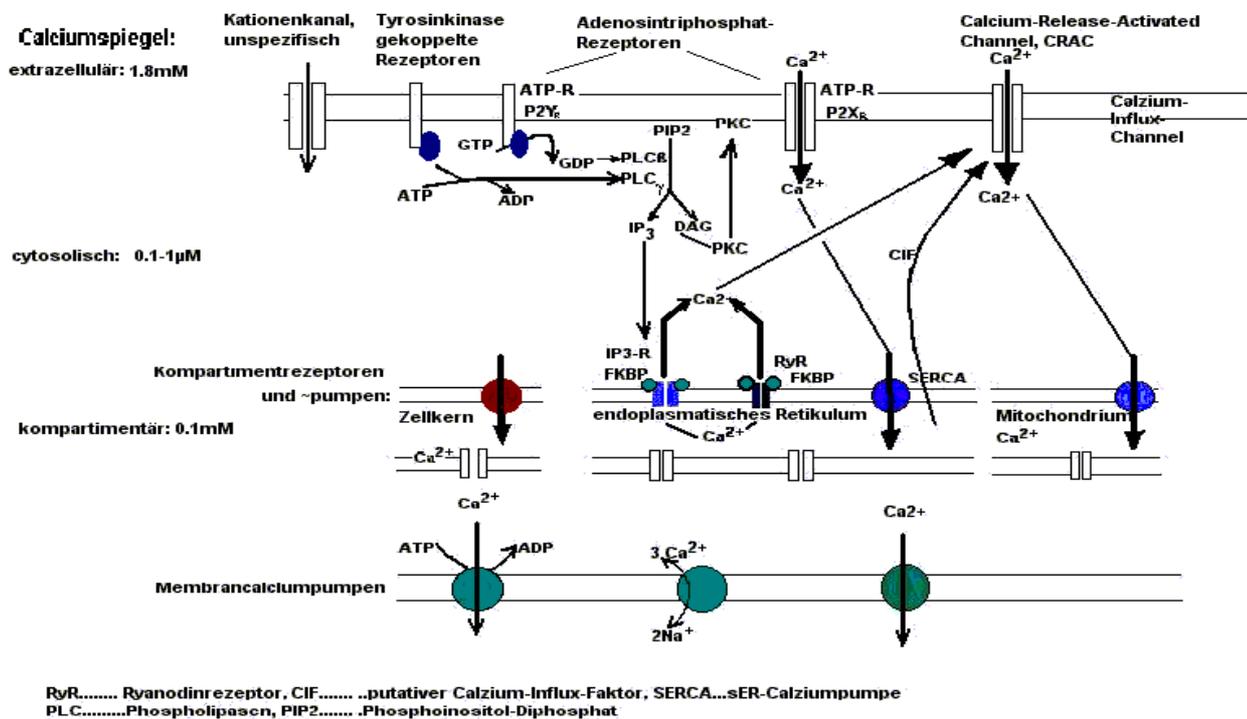


Abbildung 5: schematische Darstellung der Calciumregulation beim Makrophagen

GTP = Guanosin-Triphosphat, PLC β, PLCγ = Phospholipasen C_β und γ, PIP₂= Phosphatidylinositol-diphosphat, IP₃ = Inositoltriphosphat, DAG = Diacylglycerol, CIF = Calcium-influx-Faktor, SERCA = smooth endoplasmatic reticulum calcium pump, RyR = Ryanodinrezeptor, FKBP = IP₃-Rezeptor-Cofaktor, PKC = Phosphokinase C

Weiterhin wird der zelluläre Stoffwechsel auf der Ebene der Genexpression einerseits der Enzyme andererseits distinkter Rezeptoren und Mediatoren intrazellulärer und extrazellulärer Natur geregelt.

Wichtiger ubiquitärer enzymatischer Cofaktor und Genregulator ist neben Spurenelementen wie Lithium und Zink, das in wässriger Lösung dissoziiert vorliegende Calciumion.

Verschiedene Extrazellulärmembranrezeptoren und ~ Ionenpumpen sowie auf den Membranen der intrazellulären Kompartimente befindliche Ionenleitfähigkeiten und ~ Pumpen gestatten es eukaryontischen Zellen, ihren cytosolischen Calciumspiegel in einem relativ engen Rahmen (etwa 10^{-7} bis 10^{-9} M) aufrecht zu erhalten und zu regulieren und damit gegenüber den Kompartimenten (etwa 5×10^{-7} M) und dem Extrazellulärmilieu (10^{-3} bis 10^{-4} M) einen Gradienten aufrechtzuerhalten (Angaben aus Stryer, Biochemie, S. 1024).

Obgleich diese regulatorischen Systeme in jeder Zelle vorkommen, sind beispielsweise spannungsabhängige Calciumleitfähigkeiten als Beitrag zur Calciumionenkonzentrationsregulation zwar in Neuronen zu finden in Makrophagen aber kaum vorhanden. Das gleiche gilt für Ryanodinsensitiven Rezeptoren der Zellen mit erregbaren Membranen, also Neuronen und Muskelzellen (Sutko, J.L. 1997).

Bei Zellverbänden und Geweben fungieren außerdem die GAP-Proteine (Connexine), die zur interzellulären Signalübermittlung, Ionenregulation und zum Stoffaustausch dienen, bei abnorm ansteigendem Calciumspiegel als Zellentkoppler aus dem Gewebeverband.

Calcium kann sekundär nach Ligandenbindung extrazellulär über ligandengesteuerte Ionenkanäle in die Zelle gelangen, wobei der Calciumstrom abhängig ist von Ligandenwirkdauer und Rezeptorfunktionszustand und proportional ist für die Menge gebundenen Ligandens (Quantelung).

Desweiteren gelangt Calcium durch erleichterten Transport oder passive Diffusion in die Zelle, oder wird über metabotrope, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren Phospholipase-vermittelt über ligandenspezifische Inositoltriphosphat/Diacylglycerol-getragene Signalwege aus verschiedenen intrazellulären Speichern frei-gesetzt: dem endoplasmatischen Retikulum, dem Perikaryon, dem Golgi-Apparat oder den Mitochondrien.

Während Inositoltriphosphat direkt über Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums Calciumionen aus dem ER zu mobilisieren in der Lage ist, aktiviert Diacylglycerol die Proteinkinase C, die nachfolgend aus dem Cytosol in die Plasmamembran transloziert wird und dort eine Reihe von Proteinen phosphoryliert und so in ihrem Aktivitätszustand beeinflusst. Das aus den Speichern freigesetzte Calcium kann entweder selber oder zusammen mit einem Calciuminflux-Faktor an der Plasmamembran einen weiteren, von hyperpolarisierenden Pulsen unabhängigen Calciumeinstrom auslösen, I_{CRAC} (Parekh und Penner, 1997).

Neben Liganden- oder spannungsgesteuerten Calciumleitfähigkeiten existieren noch weitere spannungs- oder von intrazellulär durch zyklische Nucleotide gesteuerte, nichtspezifische Kationenkanäle, sowie Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität, die nach Ligandenbindung und Autophosphorylierung zur Aktivierung verschiedener zellulärer Systeme durch Phosphorylierung

führen können und so Aktivitätsmuster einzelner Ionenleitfähigkeiten beeinflussen (Nüße et al., 1997, Parekh et al., 1997 und 1998, Schrentzel, 1998, Nuttle et al., 1994, Sutko, J.L., 1997).

Die Entfernung des Calciums aus dem Zytosol der Zelle ist ein aktiver ATP-abhängiger Transportvorgang oder verläuft sekundär über einen Natrium/Calciumantiporter in der Plasmamembran, und in die Kompartimente energieabhängig über ATP (Saier, M.H. jr. et al., 1999).

Der zytosolisch erhöhte Calciumspiegel aktiviert eine Unzahl zellulärer Proteine wie die Stickstoffoxydsynthase, das Calcium-Calmodulin, Phosphokinasen und viele andere und trägt direkt zur Genaktivierung und Veränderung des Aktivitätszustands der Zellen bei. Drastisch wird dies deutlich am Beispiel der Regulation der Muskelkontraktion, bei der das Calmodulin eine entscheidende Rolle in der Steuerung der Myosin-Leichte-Kette-Kinase spielt.

Über den zytosolischen Calciumspiegel entscheiden einerseits also die Anwesenheit extrazellulärer Aktivatoren, andererseits intrazelluläre Systeme zyklischer Nukleotide/ Phosphodiesterasen, der Energiestatus (ATP/ADP+AMP-Quotient) und Phosphatasen/ Phosphorylasen.

Auf der Ebene der Calciumcalmodulinkinase konvergieren außerdem Signalübertragungsprozesse von Calcium und cAMP, die die Phosphodiesterasen, Adenylatzyklase-Isoformen, Proteinkinase C und Proteinkinase A steuern.

Zellen sind also in der Lage, über eine Unzahl physiologischer Prozesse ihren Calciumhaushalt zu regulieren, was auch hinsichtlich der Transskription bestimmter Calcium-abhängiger Gene und beim programmierten Zelltod bei fast allen Zelltypen und vorallem bei neuronalen Release-Vorgängen eine entscheidende Rolle spielt (Berridge et al., 1998).

Potentiell sind somit alle Systeme, die an den Calciumhaushalt knüpfen auch dazu befähigt, den Zellen als regulatorisches Werkzeug desselben zu dienen. Daneben sind die meisten Oberflächenrezeptoren mit Verbindung zum Calciumhaushalt auch Induktoren wichtiger Signalübertragungswege zur Regulation der Transskription vieler verschiedener Gene (Beyer et al., 1991, Gu, B., et al., 1998, Humphreys, Dubyak, 1998).

Speziell Humanmakrophagen verfügen über ein großes Spektrum nicht-spannungsabhängiger Ionenleitfähigkeiten für Kalium, Calcium und Protonen (Ashen et al., 1995), die auch teilweise die Ionenströme anderer Leitfähigkeiten beeinflussen (Holevinsky et al., 1994). Dabei spielen Ligandengesteuerte Ionenkanäle und dabei vorallem diejenigen mit Kalium- und Calciumleitfähigkeit wichtige Rollen, während reine Natriumleitfähigkeiten praktisch nicht vorkommen (s. Tabelle 1).

Bei den Kaliumleitfähigkeiten findet man speziell auf Monozyten und Monozyten-abgeleiteten Makrophagen vorallem die nichtselektiven Kationenkanäle und Ein- bzw. Auswärtsgleichrichter mit unterschiedlicher Leitfähigkeit (2 bis 10 Mikrosiemens, small conductance, sowie 10-200 Mikrosiemens, large conductance).

Darunter befinden sich auch einige, deren Öffnung durch zyklische Nukleotide von intrazellulär gesteuert werden: cGMP aktiviert einen nicht-spannungsgesteuerten Kaliumkanal.

Solche Ionenleitfähigkeiten dienen den Zellen vornehmlich dazu, ihre Ionenkonzentrationen, die Osmose, die bei inflammatorischen Prozessen drastisch verändert sein können, und bei ödembildenden Vorgängen zu regulieren.

Wie eingangs erwähnt, führen beim Makrophagen und der Mikroglia sehr verschiedene Signale zur Expression eines gleichartigen Spektrums an Ionenleitfähigkeiten. Von diesen haben vor allem einige ligandengesteuerte Ionenleitfähigkeiten (also ionotrope Rezeptoren) mitunter auch Funktionen in der Übermittlung extrazellulärer Signale nach intrazellulär durch Aktivierung von Signalkaskaden der zweiten Botenstoffe. Das gilt vor allem für einige Calciumleitfähigkeiten, wie auf Makrophagen für den purinergen P2X₇-Rezeptor (Ralevic, V., Burnstock, G, 1998, Gomez-Cambronero und Keire, P., 1998, Hayes et al., 1999, Kushner et al., 2000), der im Gegensatz zu P2X₇-Rezeptoren auf Zellen diverser Gewebe einen etwa 170 Aminosäuren umfassenden N-Terminus aufweist und nach Aktivierung seinerseits die Phospholipase D aktiviert.

Die einerseits als Neurotransmitter und Entzündungsmediatoren andererseits derzeit verstärkt diskutierten Purine und deren Rezeptoren, denen eine entscheidende Rolle beim Zusammenspiel Nervensystem/ Immunsystem zugeschrieben wird, sollen im Folgenden in Bezug auf Makrophagen besprochen werden.

1.2.2 System purinerger Rezeptoren:

Rezeptoren für Purine, Purinbasen und verschiedene Derivate finden sich auf praktisch allen Körpergeweben.

Im Wesentlichen werden zwei Purinorezeptorklassen, P1- und P2-Rezeptoren und drei (P1) bzw. zwei Familien (P2) unterschieden.

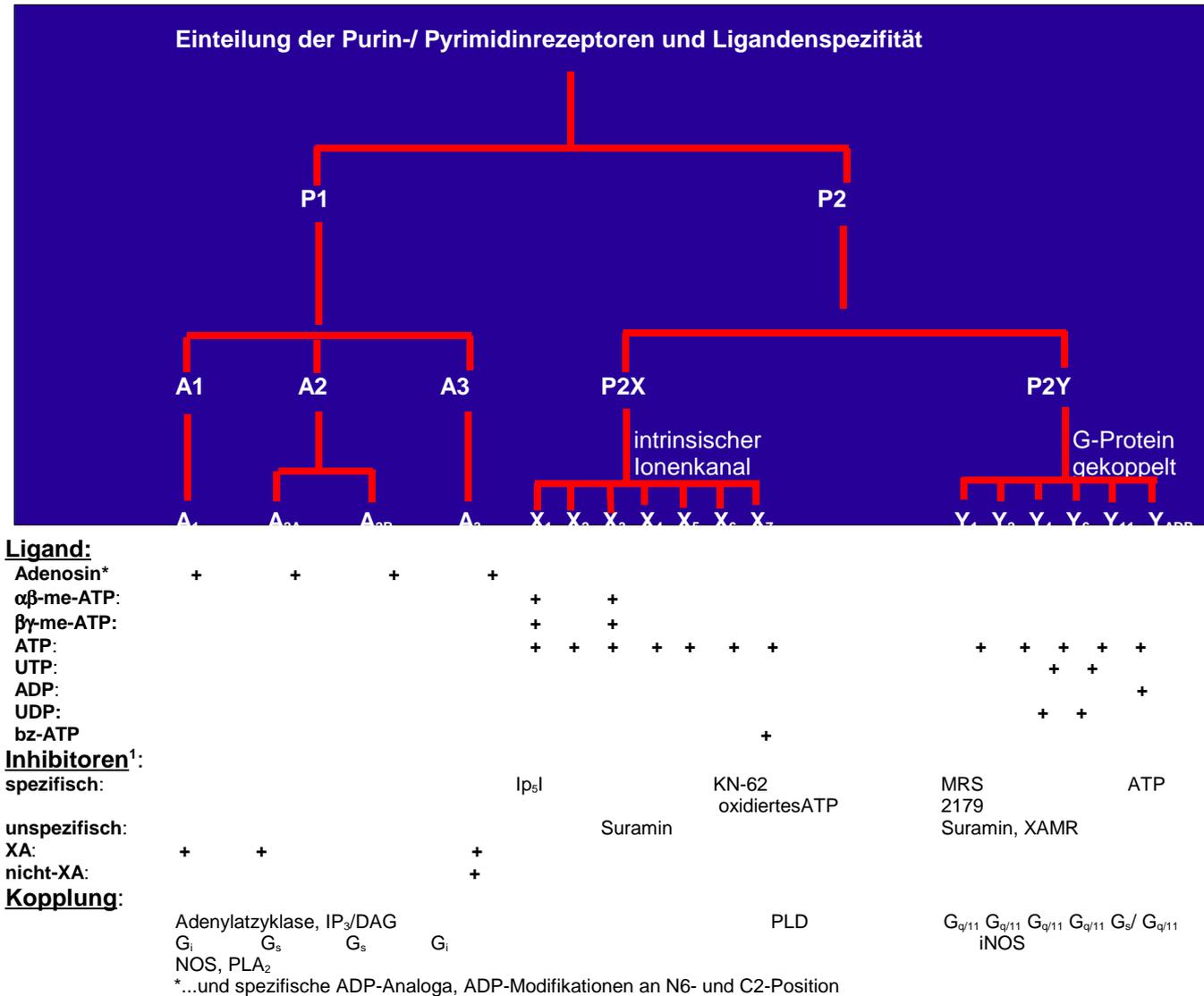


Abbildung 6: Übersicht über die Klassen der Purinrezeptoren und deren spezifische Agonisten

Abkürzungen: XA = Xanthin-Alloxazine, ab-me-ATP = alpha-beta-Methyl-Adenosin-5'-Triphosphat, ATP = Adenosin- 5'-Triphosphat, UTP = Uridintriphosphat, UDP = Uridindiphosphat, bz-ATP = 2',3'-O-benzoyl-benzoyl-Adenosintriphosphat, Ip5I = Di-Inosin-5', 5''-Pentaphosphat, KN-62 =1-[N,O-bis-(5-Isoquinolinsulfonyl)-N-methyl-L-Tyrosyl-Phenylpiperazin, MRS 2179 = N⁶-Methyl-2'-Desoxyadenosin-3',5'-Diphosphat, XAMR = 8-(3,5-Dinitrophenylencarbonylimino)-1,3,5-Naphtale-trisulfon-säure, Trinatriumsalz. spezifische Inhibitoren¹ aus: trends in pharmacological sciences (Tips)receptor and ion channel nomenclature supplement 2000, pp. 72-75, unspezifische Inhibitoren aus Ralevic, V., Burnstock, 1998

Nach neuerer IUPAC-Nomenklatur (aus: Trends in pharmacological sciences, nomenclature supplement 2000) die nach einer früheren Einteilung P1 und, P2X, P2Y, P2YADP und P2Z unterschied, sind seit 1996 Kriterium für die Zuordnung 40 % Sequenzhomologie, sowie pharmakologische Charakteristika: Ligandenspezifität, ionotrope- oder metabotrope Eigenschaften und Spezifität für verschiedene stabile ATP-Analoga.

Danach geht man innerhalb der Familien von vier (P1), sieben (ionotrope: P2X) und zwölf (metabotrope: P2Y) Rezeptor-Klassen mit unterschiedlicher Ligandenspezifität aus, von denen folgende auf Geweben von Mammalia-Geweben gefunden werden:

Bis heute sind kaum wirksame spezifische Antagonisten zum Studium der einzelnen Subklassen vorhanden, was Aussagen zur Pharmakologie an einzelnen Rezeptorsubklassen erschwert.

Oft wird die Ligandenwirkdauer durch Ektonukleotidasen sehr stark beeinflusst. Inhibitoren wie Suramin erlauben zwar die funktionelle Blockade der Ektonukleotidasen, inhibieren aber auch nur einen Teil der P2Y-Rezeptoren, während P2X-Rezeptoren teilweise inhibiert, teilweise aber auch in ihrer Funktion verstärkt werden.

Der einzige Rezeptor, der spezifisch nach ATP als Liganden aktiviert und insensitiv ist für ATP-Derivate, ist der P2Y₁₁-Rezeptor.

Die Subklassifikation in 7 Säuger P2X- und 5 P2Y-Rezeptoren erfolgte in Abhängigkeit von ihren distinkten pharmakologischen Eigenschaften und Purin- bzw. Pyrimidin- (P2Y₄ und P2Y₆, UDP) Antwortprofilen, die vor allem in *Xenopus*-Oozyten-Expressionsansätzen beschrieben wurden. Ein schwerwiegendes Manko solcher Ansätze ist allerdings die Regulation und wenn man so will, molekulare Kommunikation der beteiligten Sekundärsysteme, die bei nativen Rezeptoren zwar vorhanden sind, aber in Expressionssystemen teilweise nicht mit erfaßt werden. Zumindest bei P2Y-Rezeptoren bedeutet die Expression eines Rezeptors nicht zwangsläufig auch die der sekundären regulativen Systeme. Immerhin ist denkbar, dass Rezeptoren, die eine Signalkaskade triggern, auch durch diese reguliert werden. Solche Studien sind nur an nativen Systemen durchführbar, und dazu braucht man allerdings Agonisten und Antagonisten, mit denen man pharmakologisch zwischen den verschiedenen Rezeptorklassen unterscheiden kann (Ralevic, V. und Burnstock, G., 1998, Arbuzova et al., 1998, King, B.F. et al. 1998).

Die bisherige Charakterisierung der multiplen Formen der P2X-Rezeptoren hat ergeben, dass häufig verschiedene P2X-Rezeptoren auf denselben Geweben koexprimiert werden, in verschiedenen Proportionen.

Die meisten der P2X-Rezeptoren sind Multiuntereinheit-Rezeptoren, die als Heterodimere eine von Monomeren deutlich zu unterscheidende Pharmakologie aufweisen (King, B.F. et al., 1998).

Die P2X-Rezeptoren werden sehr effektiv durch Kationen in ihrer Aktivität beeinflusst.

2-Methylthio-ATP ist ein stabiles ATP-Derivat, das gleichermassen alle Klassen von P2-Rezeptoren aktiviert.

Eine Ektonuklease-Aktivität verschiedener Rezeptoren kann nachhaltig die Agonisten-eigenschaften verändern.

Nicht-selektive Antagonisten, die bislang als P2-Rezeptorblocker verwendet wurden, können auch die Ektonukleotidase-Aktivität blockieren und allosterische Effekte auf den Rezeptor ausüben. Ein Beispiel hierfür ist das Suraminderivat XAMR.

Bei Studien an akut isolierten Zellen haben sich verschiedentlich Schwierigkeiten in der Interpretation zu P2-Rezeptoren der Zellen in Kultur ergeben, da diese teilweise ihre Eigenschaften ändern. Dies gilt besonders für Rattenastrozyten. Unmittelbar nach der Isolierung ist bei diesen keine ATP-Antwort meßbar. In der Primärkultur werden die P2-Rezeptoren jedoch hochreguliert. Daher ist bei der Interpretation von Studien zu P2-Rezeptoren an Zellen in Kultur Vorsicht geboten (Ralevic und Burnstock, 1998).

Von besonderer Bedeutung für den Level der Aktivierung über Purinorezeptoren derselben oder benachbarter Zellen sind P2X₁ und P2X₃-Rezeptoren, da diese ausgesprochen schnell desensitivieren und vorallem auf neuronalen Zellen eine Rolle bei der postsynaptischen Reizweiterleitung spielen können.

Quellen für extrazelluläres ATP:

Ein autokatalytischer ATP-Release wurde bislang bei Endothelialzellen gefunden.

Eine ATP-Freisetzung von Zellen kann durch viele meist unphysiologische Stimuli ausgelöst werden, wie etwa mechanischen Stress, Hypoxie und findet bei Gewebsuntergängen im Rahmen der Nekrose statt oder bei zentralnervösen Läsionen, bei denen ATP bei Astrozyten als Auslöser einer reaktiven Astroglieose in Verbindung mit Hypertrophie und Formveränderung diskutiert wird (Illes, P., unveröffentlichte Beobachtungen).

Außerdem wurde eine Signalübertragung über ATP von durch NK-Zellen lysierten Tumorzellen an Humanmakrophagen demonstriert (Oshimi et al., 1999).

1.2.3 Gewebeverteilung der Purinrezeptoren:

Für den humanen Organismus liegen verschiedene Befunde zur Funktion und Verteilung purinerger Rezeptoren vor. Der augenblickliche Stand der Dinge bezüglich der Strukturaufklärung humaner purinerger Rezeptoren ist die Charakterisierung von P2Y₁, Y₄ und Y₁₁, sowie dem endogenen P2Y_{1like}-Rezeptor (Daten aus NCBI-Genbank des amerikanischen Health-Departments).

Während P1-Rezeptoren sowohl im zentralen als auch im peripheren Gesamtnervensystem und

auf praktisch allen Körpergeweben gefunden werden, ist die Verteilung von ionotropen P₂-Rezeptoren distinkter.

Die Funktion der purinergen Rezeptoren im Nervensystem ist noch kryptisch. Möglicherweise fungieren ATP- und funktionelle Derivate als endogene Liganden der verschiedenen Rezeptoren als Neuromodulatoren oder Cotransmitter. Die entsprechenden Rezeptoren weisen einen ausgesprochen ausgeprägten funktionellen Connex zu verschiedenen nicht-Purinrezeptor-Rezeptorklassen auf.

P1-Rezeptoren:

Die Rezeptoren der P1-Familie sind allesamt G-Protein-gekoppelte metabotrope Proteine mit sieben Transmembrandomänen und Spezifität für den endogenen Liganden Adenosin. Die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine, die sie zu Mitgliedern der P1-Familie macht, bedeutet aber nicht auch eine funktionelle Gleichheit. Drei der vier bislang beschriebenen Proteine, der P1A₁, der P1A_{2A} und der P1A₃-Rezeptor sind sensitiv gegenüber Inhibitoren der Xanthin-Alloxazine, während der P1A_{2B}-Rezeptor von diesen nicht gehemmt wird (Ralevic, V., Burnstock, G., 1998).

Der **P1A₁** übernimmt ähnliche Funktionen wie der Histamin H₁-Rezeptor auf Mastzellen bei der Degranulationsvermittlung, koppelt in derselben Weise an Kaliumleitfähigkeiten verschiedener Gewebe wie der Bradykinin-Rezeptor, sowie Glutamatrezeptoren auf Neuronen, der Thrombinrezeptor und der α₁-adreno-Rezeptor, sowie ein Rezeptor der Gamma-Aminobuttersäure (GABA), den inhibitorischen Neurotransmitter im Zentralnervensystem.

Der P1A₁-Rezeptor ist in das Geschehen um die Regulation der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese involviert, die von diesem hochreguliert wird.

In der Signalübertragung des aktivierten Rezeptors spielen die Adenylatzyklase, die Phospholipase C und die Phospholipase A₂ eine entscheidende Rolle, die auch auf P₂Y₁ und Y₂-Rezeptoren mit in die Signalübertragung involviert ist.

Der **P1A_{2A}**-Rezeptor wird vorallem im dopaminergen Nervensystem gefunden und beeinflusst über ein inhibitorisches G-Protein die Adenylatzyklase und darüber auch den Dopamin-2-Rezeptor.

Der **P1A_{2B}** ist beteiligt an der Degranulationsvermittlung humaner Mastzellen und findet sich auf praktisch allen Körperzellen. Über Inhibition einer Serin/Threonin-abhängigen Protease wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies getriggert. Dieser Rezeptor ist der einzige der P1-Familie ohne Selektivität für Methylxanthine.

Der **P1A₃**-Rezeptor ist über ein inhibitorisches G-Protein vorallem an der funktionellen Inhibition excitatorischer Neurone beteiligt. Er wird in Lunge und Leber exprimiert, triggert auf Mastzellen den Histaminrelease und steuert die Apoptose bei Eosinophilen Granulozyten.

Aktivierung dieses Rezeptors vermittelt die Konstriktion von Gefäßmuskelzellen etwa in Folge entzündlicher Vorgänge und wird massiv in der Lunge bei Entzündungsprozessen hochreguliert.

Eine funktionelle Kopplung an Superoxyddismutase, Katalase und Gluthathionreduktase ist beschrieben (Review: Ralevic & Burnstock, 1998).

Alle dieser P1-Rezeptoren mobilisieren über die Inositoltriphosphat-getragene Signalübertragungskaskade die intrazelluläres Calcium aus den Endokompartimenten.

Während alle Rezeptoren über G-Protein-gekoppelte Mechanismen die Phospholipase und den IP₃-Weg aktivieren, koppeln sie differentiell an die Adenylatzyklase: P1A₁ und 1A₃ inhibieren diese, während die P1A₂-Rezeptoren die Adenylatzyklase stimulieren.

Die Funktion dieser Rezeptoren besteht wahrscheinlich unter anderem in der Asthma- und Ischämie-Protektion und ist - über die Aktivierung von K_{ATP}-Leitfähigkeiten - im Myokard an einer reaktiven Reduktion der Infarktstärke beteiligt.

P2-Rezeptoren:

Alle Rezeptoren der **P2X**-Familie sind ionotrope Calciumkanäle mit Spezifität für den endogenen Liganden Adenosintriphosphat. Sie sind ausgesprochen sensitiv gegenüber der Modulation durch zweiwertige Kationen, wie Zn²⁺ (Zink), Ni²⁺(Nickel), Cu²⁺(Kupfer), Mn²⁺ (Mangan) und Cr²⁺(Chrom).

Während die meisten dieser Rezeptoren innerhalb von Millisekunden bis Sekunden inaktivieren, sind vor allem **P2X₁** und **X₃**-Rezeptoren diejenigen mit einer Inaktivierungskinetik im Bereich von 1 bis 3 Millisekunden. Daher wird diesen eine mögliche neuronale Funktion zugeschrieben, während die anderen eher an der Regulation der Genexpression und Calciumhomöostase beteiligt sind.

Für den **P2X₂**-Rezeptor ist eine Apoptose-Vermittlung in Thymozyten beschrieben (RP-2-Zellen).

P2X₆ wird vor allem auf Bronchialepithelien stark exprimiert.

Der **P2X₇**-Rezeptor, der auf vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird, aktiviert, obwohl an sich ein ionotropes Protein, über die Phospholipase D und Phosphatidylsäure und Proteinkinasen den IL-1β-Release (Gomez-Cambrero und Keire, 1998, Humphreys und Dubyak, 1998) auf Makrophagen und moduliert die Zelladhäsion über Regulation der L-Selektin-Expression. Außerdem in die hepatozelluläre Zytolyse involviert, hat dieser Rezeptor noch einige Besonderheiten: nach Aktivierung dieses Rezeptors ist die Bildung einer nicht-selektiven Pore auf Maus- (Beyer et al. 1991) und Humanmakrophagen (Nuttall und Dubyak, 1994, Humphreys und Dubyak, 1998 I und II) beschrieben und kann aktiviert auf Hepatozyten diese in die Apoptose treiben. In Makrophagen erfüllt dieser Rezeptor wohl eher andere Funktionen: nach Phagozytose von Apoptose-Körperchen induziert durch deren Lyse freierwerdendes ATP in den Phagolysosomen diese nichtselektive Pore mit einer Leitfähigkeit bis 900kDa. Durch diese können anionische Peptide ins Cytosol gelangen, werden prozessiert, im Endoplasmatischen Retikulum auf MHC-I- Proteine geladen und immunkompetenten T-Zellen präsentiert (Silverstein et al., in press). Die Bildung der Pore wie auch die Signalübertragung dieses Rezeptors über Phospholipase D sind insofern eine Besonderheit, da ein an sich ionotropes Protein metabotrope Eigenschaften besitzt.

In Humanmakrophagen hat der Rezeptor einen 170 Aminosäure umfassenden C-Terminus, was für die Möglichkeit weiterer Signalübertragungswege getragen von diesem Rezeptor spricht.

Die metabotropen **P2Y-Rezeptoren** koppeln G-Protein-vermittelt an die Phospholipasen C (alle), PLA₂, C_β und PLD (P2Y₁ und Y₂) und über IP₃-Generierung an intrazelluläre Calciumfreisetzung. P2Y₁, Y₂ und Y₄ sind in die Induktion der Stickstoffoxydsynthese (im Folgenden als iNOS bezeichnet, von engl. Nitric oxide synthase) involviert.

Der **P2Y₁**-Rezeptor findet sich vorallem im ZNS, Erythrozyten, Pankreas β-Zellen, Mastzellen, auf dem Gefäßendothel und auf Rattenastrozyten. Er koppelt an Calciumrelease-activated Channels (CRAC), sowie MAP-Kinase-Signalübertragungswege, die Prostacyclin-Generierung und Arachidonsäure-abhängige Ionen-leitfähigkeiten. Im bovinen Aorta-Gefäßendothel führt Aktivierung dieses Rezeptors zur Vasodilatation nach Epinephrin (Boarder, M. et al.) und im Striatum der Ratte zu gesteigertem Dopaminrelease.

Der **P2Y₂**-Rezeptor ist während zellulärer Differenzierungsvorgänge unterschiedlich reguliert: auf HL-60-Zellen geht dieser während der Ausdifferenzierung in Monozyten/Makrophagen verloren. Er wird in vielen Geweben und auf immunkompetenten Zellen exprimiert, wie etwa den HL-60-Zellen, Makrophagen, ebenso bei PC12-Zellen, Epithelien, sowie Herz, Lunge, Leber, Nieren, auf Astrozyten und chromaffinen Zellen. Die Signalübertragung erfolgt über G_{i/o} und q₁₁-Proteine und – neben den erwähnten Phospholipasen- über MAP-Kinase und Protein-Tyrosin-Phosphorylierung. Dieser Rezeptor koppelt in der Lunge an einen Calcium-sensitiven Chloridkanal und steigert die Cyclooxygenase-Funktion.

Auf Rattenmesangiumzellen führt Aktivierung des Rezeptors durch ATP oder UTP zur verringerten NO-Freisetzung einerseits und wie auf Proteinebene und mRNA-Ebene gezeigt werden konnte, zur verringerten Expression nach LPS-Induktion (Mohaupt et al., 1998), in bovinen Aorta-Zellen zur gesteigerten NO-Freisetzung (Boarder, M. 2000, nichtveröffentlichte Beobachtungen).

Der **P2Y₄**-Rezeptor wird vorallem auf der Plazenta, in der Lunge und den Rattenpankreaszellen gefunden. Die Signalübertragung führt zur Prostacyclinestehung, Induktion der Stickstoffoxydsynthese und zur Transskription von früh-/sofortaktivierten Genen (immediate early genes, IEG). In der Lunge steuert dieser Rezeptor die Leukozytenadhärenz, ist an der Neutrophilen-Granulozyten Degranulation beteiligt und der Induktion der Superoxyddismutase in HL-60-Zellen.

Der **P2Y₂**-und der **P2Y₄** Rezeptor sind spezifisch für Uridintriphosphat, der **Y₆** ist spezifisch für Uridindiphosphat und sind somit im engeren Sinne keine Purinrezeptoren. Die Subsumierung dieser Rezeptoren in die Klasse der Purinrezeptoren beruht auf deren Fähigkeit, auch ATP spezifisch zu binden (Ralevic et al. 1998).

Der **P2Y₇**-Rezeptor ist an der Leukotrien B₄-Freisetzung beteiligt, während der P2Y₁₁-Rezeptor auf Makrophagen, der Humanplazenta, dem Milzepithel und auf HL-60-Zellen exprimiert wird. Die anderen Rezeptoren der P2Y-Familie sind auf Zellen von *Rattus norvegicus* gefundene Analoge beispielsweise des Vogel-P2Y₅-Rezeptors und sind bei menschlichen Zellen bislang nicht beschrieben.

Regulation der P2-Rezeptor-Expression auf Humanen Monozyten/Makrophagen durch proinflammatorische Signale und Lipopolysaccharid:

Während die Aktivierung einiger der P2-Rezeptoren auf THP-1 Mausmakrophagen bzw. bovinen Aortaendothelien zu einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine und Prostaglandine führt (P2X₇:IL-1 β , P2Y₁ und P2Y₂:Prostaglandine, Humphreys und Dubyak, 1998 II, Boarder, 2000, unveröffentlichte Beobachtungen), regulieren diese wiederum die P2-Expression auf humanen Monozyten und Makrophagen: während der **P2X₁-like** und **P2Y₂-like**-Rezeptor schnell runterreguliert werden, werden beispielsweise der P2X₇-Rezeptor und P2Y₂-Rezeptor massiv hochreguliert (Humphreys und Dubyak, 1998 I).

Eine Rolle des P2X₇-Rezeptors bei der Signalübertragung des bakteriellen Zellwandfragmentes Lipopolysaccharid (LPS) in der Entzündungsauslösung wird diskutiert.

1.2.4 Induzierbare Stickstoffoxydsynthase (iNOS):

Die Stickstoffoxydsynthase existiert in bislang drei bekannten Isoformen: als neuronale oder nNOS, endotheliale (eNOS) und als induzierbare oder iNOS (Beck et al., 1999).

Da im Rahmen dieser Arbeit ein wesentliches Augenmerk auch zellulären Prozessen bei Humanmakrophagen und deren Regulation durch dieses Enzym galt, soll an dieser Stelle näher auf funktionelle Charakteristika eingegangen werden.

Dabei liegt der Schwerpunkt vor allem auf der gewebeabhängigen Regulation der Expression des Enzyms und dessen physiologischen Besonderheiten und der Regulation durch und im Rahmen von inflammatorischen Vorgängen.

Die induzierbare Stickstoffoxydsynthase dient unter bestimmten Umständen dem Töten von Mikroorganismen und Tumorzellen. Deren Stoffwechselprodukte, zusammenzufassen als NO_x, umfassen verschiedene Mono-, Di- und Tristickstoffoxyde, die als enzymatisches Reaktionsprodukt im Zellstoffwechsel aus Arginin unter Anwesenheit von Sauerstoff (O₂) und dem Coenzym NADPH unter dem regulatorischen Einfluß von Ca²⁺ neben dem weiteren Endprodukt Citrullin entstehen. Dieser Stoffwechselweg ist für die Stickstoffoxydsynthase nahezu alle humanen Körperzellen beschrieben. Ganz wesentliche Funktionen kommen den Nitritspezies zu bei der akuten immunologischen Abwehr pathogener Erreger. Sie werden freigesetzt durch aktivierte Makrophagen und üben auf die Gefäßendothelien einen direkten vasodilatatorischen

Effekt aus und modulieren neuronale synaptische Übertragungsvorgänge und sind selbst eine Art 'unkonventioneller' Neurotransmitter oder zumindest -modulator, da ein spezifischer Rezeptor fehlt (Jungi et al., 1999).

Zum Studium der Enzymaktivität steht heute ein recht breites Repertoire an Inhibitoren, Aktivatoren und monoklonaler Antikörper zur Verfügung. Gängige Inhibitoren sind beispielsweise, N^G-Acetyl-D-Arginin (NAA) oder Diphenyleniodonium-Derivate, als NO Donatoren Glycerol-Trinitrit oder S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin, SNAP.

Außerdem existieren zur funktionellen Enzymaktivitätsmessung einige fluoreszenzaktive Indikatorstoffe für NO*, Diaminofluorescein 2 und 4, die in Anwesenheit von NO* Triazoliumprodukte bilden (Nakatsubo et al., 1998, Stuehr, D.J. 1991).

Die drei verschiedenen bislang beschriebenen Isoformen, e-, n- und iNOS sind unterschiedlich auf die Gewebe verteilt. Während eNOS konstitutiv in Endothelzellen exprimiert ist und die nNOS in Zellen, die ihren Ursprung in der Neuralleiste haben, wird die induzierbare NOS nur unter bestimmten Stoffwechsellagen und infolge inflammatorischen Prozessen, vorallem von aktivierten Makrophagen exprimiert.

Das induzierbare Enzym wird vorallem durch Cytokine der angeborenen Immunität durch Makrophagen nach Lipopolysaccharid, einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien und durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und γ -Interferon induziert.

Der Zeitverlauf der Induktion zur De-Novo-Synthese des Enzyms beträgt etwa 6 bis 8 Stunden. Das Enzym bleibt aktiv für Stunden und Tage und hat dann bei vergleichbarem Unit-Anteil eine etwa um das 1000-fache höhere NO-Produktion als die endothelialen und neuronalen Isoenzyme. Die zellulären Auswirkungen der NOS-Aktivität sind in entscheidendem Maße von der Menge des produzierten NOs abhängig. Generell kann man sagen, dass geringe Mengen NO den Stoffwechsel positiv regulieren, während große NO-Freisetzung wie sie infolge entzündlicher Prozesse auftreten kann, Protein- oder sogar Zelluntergang bedeuten kann, und vorallem immunkompetente Zellen in die Apoptose treibt.

In geringen Konzentrationen wirkt sich NO, wie man vorallem aus Knockout-Tierversuchen weiß, bei neuronalen Zellen postsynaptisch produziert unmittelbar, da es direkt membrangängig ist, auf die präsynaptischen Vorgänge aus. Dieses triggert dort die Guanylatzyklase zur cGMP-Produktion und hat postsynaptisch Einfluß auf die Langzeitpotenzierung (Sequeira et al., 1999, Wilson et al., 1997 und 1999, Haas et al, 1999) und bei Makrophagen vorallem auf den zellulären Stoffwechsel:

so wird die Guanylat-Zyklase-Aktivität getriggert und somit die Entstehung von cGMP stimuliert, einem wichtigen Intermediat vieler zellulärer Signalübertragungsprozesse. Viele Membranrezeptor-gebundene Vorgänge, Transmitterfreisetzung aus Nervenendigungen so auch einige der über purinerge Rezeptoren laufenden zellulären Kommunikationswege, sind unmittelbar von cGMP abhängig.

In höheren Konzentrationen interagiert freigesetztes NO vor allem mit Eisen-Schwefel-Proteinen, Thiolgruppen, Übergangsmetallen und komplex gebundenen Metallen in Chelator-Proteinen (Bsp.: Katalase, Cytochrom C der Atmungskette) und somit indirekt mit der ATP-Erzeugung (Brookes et al., 1999). Eine derartige Veränderung oder Verringerung in der Funktion von Proteinen hat meist eine Initiation der Genexpression des zellulären Schutzapparates wie etwa der Chaperone zur Folge. Bei noch höheren NO-Konzentrationen findet eine generelle Verschiebung der Stoffwechsellage in Richtung Zellschädigung und Apoptose statt unter Anwesenheit verschiedener Faktoren des zellulären Milieus, wie etwa die Aktivierung von Caspasen und anderen apoptotischen Signalproteinen.

Struktur, Aufbau und Funktion der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase:

Das funktionelle Enzym der mammalischen NOS existiert als Dimer und wird durch insgesamt 17 verschiedene Peptide, Moleküle und Ionen reguliert. Neben den bereits erwähnten Cofaktoren Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Nikotinadenindinukleotidphosphat-diehydrat (NADPH) und molekularem Sauerstoff (O_2), haben die Monomere Bindungsstellen für Calmodulin, Ca^{2+} und für den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) sowie N-terminal eine Häm-Bindungsstelle.

Erst die Bindung aller Cofaktoren schafft die 300kDa-Maschinerie, die in der Lage ist, ein 30Da-Produkt zu bilden.

Die induzierbare NOS, auch als NOS 2 bezeichnet, ist im Unterschied zu den anderen beiden Isoformen auch bei geringsten zellulären Calciumleveln aktiv und bindet Calciumcalmodulin (CaM) mit hoher Affinität.

Dieses wiederum erfüllt eine zentrale Rolle bei der iNOS-Funktion: erstens schützt es die an dibasischen Resten reiche Calmodulinbindungsstelle gegenüber Proteasen, zweitens wird die NOS 2 nur dann funktionell exprimiert, sobald CaM anwesend ist, drittens erleichtert es den Elektronentransfer vom NADPH an die Flavine und von dort zu den exogenen Akzeptoren bei der NO-Generierung, viertens fungiert es als Vermittler der Mittelregion zwischen den Carboxyterminalen Reduktase- und den aminoterminalen Oxygenasedomänen.

Sobald Calcium anwesend ist, bindet das Calmodulin. Augenblicklich beginnen Elektronen von den Flavinen

sich Richtung Häm zu bewegen (MacMicking et al., 1997).

Regulation der Expression der Stickstoffoxydsynthase:

Die Regulation der Expression der induzierbaren NOS, die keineswegs ausschließlich auf immunkompetente Zellen beschränkt ist, erfolgt spezifisch für verschiedene Gewebe. Ein starker

Induktor für die induzierbare Stickstoffoxydsynthase ist das bakterielle Zellwandfragment LPS, das bei bakteriellen Infektionen in den Organismus gelangt und massive entzündliche Reaktionen auszulösen in der Lage ist. Interferon γ und Interleukin 1β (IL- 1β) induzieren das Enzym ebenfalls, sowie nach Tumornekrosefaktor TNF- α und werden selber als Reaktion auf LPS von verschiedenen Körperzellen hin freigesetzt.

Die iNOS wird in den meisten Gewebszellen induziert, wie etwa von Hepatozyten, Mesangiumzellen, Gefäßmuskelzellen, Myozyten, Pankreas- β -Zellen, wobei letztere ausgesprochen sensitiver gegenüber den Zytokinen erscheinen, vorallem TNF- α / IL- 1β).

LPS, IFN- γ , IL- 1β , TNF- α wirken alle synergistisch für iNOS-Expression. Infolge entzündlicher Vorgänge beim Menschen liegen auch meist mehrere Zytokine in Kombinationen vor. Das zyklische Adenosinmonophosphat, cAMP, ein ausgesprochen wichtiger zweiter Botenstoff auf zellulärer Ebene in der Signalübertragung von metabotropen Rezeptoren ist bei verschiedenen Geweben ebenfalls ein starker Induktor der iNOS (in Ratten-Gefäßzellen), in anderen Nagerzelltypen aber auch ein repressorisches Signal und führt zur Reduktion der iNOS-Expression.

Mittlerweile ist ein breites Spektrum von Cytokinen als weitere Induktoren der iNOS beschrieben, wie etwa die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-12, IL-18 und IFN- α .

Vorallem drei Signalübertragungswege münden in eine verstärkte Expression der iNOS: die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Bindung am iNOS-Promoter), etwa nach dem proinflammatorischen Zytokin IL- 1β (Eberhart et al.), und Repression nach dem lungen- und gefäßspezifischen Mediators Endothellin, ein NF- κ B-unabhängiger Signalübertragungsweg und ein CREB (calcium responsive element binding protein)-vermittelter.

Bei Aktivierung von Rezeptoren, die zu einem Anstieg des cAMP-Gehaltes führt, kann eine Induktion des iNOS-Gens durch cAMP stattfinden: in der Konsequenz führt verstärkte Bindung eines CAAT/enhancer-Bindeprotein (C/EBP) und eines cAMP-responsiven Bindeprotein an den iNOS-Promoter zur iNOS-Induktion, wobei beide notwendig sind (Eberhart, 1998, Beck, Eberhardt et.al, 1999).

Verschiedentlich konnte auf Transkriptionslevel gezeigt werden, dass Agentien, die die NF- κ B-Aktivierung bei zellulären Signalübertragungsprozessen verringern, auch die iNOS-Induktion verhindern.

Diese sind zum Beispiel Agentien mit pharmakologischer Verwendung: Dithiocarbamate, Dexamethason, Cyclosporin A. Dementsprechend wurden neue therapeutische Ansätze bei Infektionen entwickelt.

Bei bovinen von Monozyten abgeleiteten Makrophagen konnte von Jungi et al. 1999 gezeigt werden, dass Gram-negative Bakterien bzw. deren Membranfragmente (0.2-2 μ g/ml) die Stickstoffoxydsynthase stärker induzieren als gram-positive, aber dies nur moderat

durch rekombinantes bovines γ -Interferon verstärkt werden kann. Gram-positive Zellwandfragmente zusammen mit γ -Interferon inhibieren die NOS-Expression.

Interaktion der von der Stickstoffoxydsynthase gebildeten Stickstoffoxyde (NO_x) mit Proteinen und Enzymsystemen:

Eine Vielzahl zellulärer Stoffwechselprozesse werden durch das vom NOS-System generierte NO auf der Ebene der Proteinaktivität beeinflusst.

NO* als ausgesprochen reaktiver Metabolit moduliert eine ganze Reihe von Signalübertragungswegen und Kinasen durch direkte Modifikation der beteiligten Enzymsysteme entweder an Metallgruppen, Thiolgruppen oder Tyrosinresten.

I lösliche Guanylat-Zyklase:

Die Aktivierung der Guanylatzyklase läuft über eine Nitrosierungsreaktion des Haemteils, damit einhergehend eine Änderung im zytosolischen Level von cGMP. Dadurch werden cGMP-regulierte Ionenkanäle getriggert, cGMP-regulierte Phosphodiesterasen aktiviert und cGMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert oder deaktiviert.

In sensorischen Systemen ist cGMP (visuelles und olfaktorisches System) ebenfalls wichtig: der Sehvorgang beruht im Wesentlichen auf der Schließung von *Kationenkanälen*, die direkt durch cGMP, das beim lichtinduzierten Rhodopsinzerfall entsteht, reguliert werden.

Auch in olfaktorischen Zellen führt ein IP₃-vermittelter Anstieg des zellulären Calciumlevels, zur Aktivierung einer konstitutiven NOS, die in nachfolgenden Neuronen den cGMP-Level erhöht und zur Öffnung von Calciumkanälen führt.

II. Andere zelluläre Proteine:

Eine Beeinflussung von Proteinen der Signalkaskaden konnte bislang gezeigt werden für alle drei MAP-Kaskaden (an humanen peripheren Blutmonozyten), die PKC-Aktivierung, Janus-Kinasen immunkompetenter Zellen, Transkriptionsfaktoren mit Sensitivität gegenüber dem zellulären Redoxstatus (vor allem NF- κ -B) und Metalloproteasen (Beck et al., 1999).

Von Brookes et al 1999 wurde gezeigt, dass NO* in Konzentrationen um 4 μ M spezifisch und reversibel die mitochondriale ATP-Generierung (bei Mitochondrien aus dem Hirn von Wistar Ratten) inhibiert, vermutlich durch eine Oxidation von Cytochrom C (Konzentrationsabhängig bis 80 μ M NO*). Dabei spielen möglicherweise auch NO*-Produkte wie Peroxynitrit, Nitrit oder N₂O₃ eine Rolle. Für Peroxynitrit wurde von Ullrich et al die Inhibition der Prostazyklinsynthase gezeigt. NO* kann über Modifikation von Kinasen und Transkriptionsfaktoren die Expression verschiedener Gene beeinflussen, etwa über die Januskinasen die MHC-II-Expression und die verschiedener

Cytokine (IL-2, IL-4 und vorallem IL-1 β).

Hohe Level an NO treiben Makrophagen, Mesangiumzellen und Neurone in die Apoptose, durch gesteigerte p53-Expression und Aktivierung von Caspasen.

Proteine, die keine Tyrosinreste enthalten, wie die Kupfer/Zink abhängige Mangansuperoxyd-dismutase sind unempfindlich gegenüber NO*.

Bei der Veränderung von physiologischen Proteinfunktionen durch die Stickstoffoxydsynthese nimmt man einen Gehalt von nur 2-10% NO im Vergleich zu dem bei Induktion von Apoptose an.

III. NO-Donatoren:

Für Monocyten/ Makrophagen ist beschrieben, dass NO-Donatoren wie Natrium-Nitroprussid (SNP), S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP) und S-Nitrosogluthathion (GSNO) zu einer verstärkten NF-kB - Aktivierung führen, einem spezifischen Transskriptionsfaktor vieler proinflammatorischer Cytokine.

Für das nach TNF- α -Freisetzung durch Lipopolysaccharid hochregulierte Interleukin 8 konnte eine Transskriptionshemmung nach durch einen NOS-Inhibitor (L-NAME) verringertem NO-Level in den Zellen gezeigt werden (Mohaupt et al., Holm et al.).

IV. Alternative Stoffwechselwege der zellulären Umsetzung von L-Arginin und OH-L-Arginin bei

Rattenhepatozyten und humanen Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten (huPMNs):

In bestimmten zellulären Systemen verhindern Inhibitoren der Stickstoffoxydsynthese nicht die zytosolische NO-Produktion, ausgelöst durch fMLP (N-formyl-methionyl-Leucocyl-Phenylalanin), das in Humanmakrophagen die induzierbare Form der Stickstoffoxydsynthese unter Anwesenheit von O₂ und dem Cofaktor NADPH zur Umsetzung von L-Arginin zu Citrullin und NO stimuliert (P. Holm et al., 1999). Der O₂-Bedarf und das entstehende NO, das sofort weiter zu Peroxynitrit reagiert, stehen in Konkurrenz zur O₂⁻-Verstoffwechslung durch die Superoxyddismutase.

Das NO löst sehr effizient eine verstärkte Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat, cGMP, durch die Guanylatzyklase aus.

In Rattenhepatozyten wird OH-L-Arginin NADPH-abhängig durch einen Cytochrom-P450-Prozess zu Citrullin und NO katalysiert.

Die Citrullin- und NO-Entstehung wird in Zellen aber auch in Lysaten nach OH-L-Arginin, nicht aber nach L-Arginin gemessen und ist durch einen Inhibitor des Cytochroms P 450s3A, Troleadomyzin, verhindert.

Bei PMNs (Polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten) ist eine NO-Produktion nach fMLP nicht messbar, lediglich nach den NO-Donatoren wie SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenizillamin) und GEA

3162 (1,2,3,4-Oxatriazolium, 5-Amino-3-(3,4)-Diphenylchlorid) steigt der Gehalt an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) um das 10 bis 20fache.

Dementsprechend werden als NO-Ziele Nitrotyrosin und ein vermehrt vorhandenes Guanylatzyklase-Produkt cGMP nur nach erhöhten NO-Spiegeln durch Donatoren in diesen Zellen beobachtet und die entsprechenden Entstehungswege sollten in experimentellen Ansätzen berücksichtigt werden und für das Studium von Nitritoxydsynthase-getragenen Vorgängen immer auch die Möglichkeit von NO-Produktion unabhängigen bzw. einer NO-Produktion über NOS-unabhängige Mechanismen, wie etwa über Cytochrom-P450-Stoffwechselwege.

1.2.5 Calciumcalmodulin und die Calciumcalmodulinkinase II (CaCAMK II):

Für verschiedene ionotrope Rezeptoren, wie etwa den NMDA-Rezeptor, aber auch metabotrope Glutamatrezeptoren wurden regulatorische Funktionen des Calciumcalmodulins gezeigt (Schnabel, 1999, Arbuzova et al., 1998). Auch die Stickstoffoxydsynthase dimerisiert nur nach Calciumcalmodulinbindung zum funktionellen Protein (s. Abschnitt 1.3). Da das Calciumcalmodulin eine Relaisfunktion in vielen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen bei der Aktivierung und Aktivitätssteuerung von Kinasen, Proteinen und Rezeptoren erfüllt, so auch LPS responsiver Gene und mit der Calciumcalmodulinkinase II für zentrale Makrophagenfunktionen wie IL-1-Induktion von Bedeutung ist (Zwilling, Eisenstein, 1994), soll dieses wichtige System hier kurz besprochen werden. Die Calciumcalmodulinkinase II (CaMk II) ist ein heterooligomeres Protein, aus einer α - und einer β -Untereinheit und wird in vielen Körpergeweben aber auch immunkompetenten Zellen aber unterschiedlich in verschiedenen Hirnregionen exprimiert.

Die CaCAMK II-Funktionen sind Calcium/Calmodulin-abhängig.

Das Enzym ist eine Serin/Threoninkinase und phosphoryliert eine Reihe von Proteinen, zum Beispiel das für Neuro-humorale Releasevorgänge auf den synaptischen Vesikeln sitzende Synapsin I, die Stickstoffoxydsynthase (NOS), sowie Tryptophan- und Tyroxinhydroxylase und IP_3 -Rezeptoren.

Sie reguliert somit unter anderem den Metabolismus von Carbohydraten, Lipiden, Aminosäuren, Neurotransmitter-Synthese und -Freisetzung, Ionenkanal- und Cytoskelettfunktionen, einen zwischen Cytosol und Plasmamembran zirkulierenden Repressor der Phospholipase C, MARCKS, sowie über Steuerung des Aktivitätszustandes von Signalkaskadeproteinen die Genexpression.

Nach kurzer Calcium-Exposition wird das Enzym aktiviert und es kommt zur Konvertierung in Ca^{2+} -unabhängiges Enzym, durch Autophosphorylierung des Thyrosinrestes Thr 286. Das Enzym spielt möglicherweise eine Rolle bei der Gedächtnisfunktion, denn CaCAMKII-defiziente Mäuse exprimieren eine aktivierte Calcium-unabhängige Form, und es zeigen sich Defizite bei der für die Umsetzung von Kurzzeit- in Langzeitgedächtnis mitentscheidende Langzeitpotenzierung, die im

Wesentlichen auf die Hippocampus-Region zurückgeht.

Bekannte Regulatoren der CaCAMK II sind der natürliche Ligand Calciumcalmodulin und KN-62.

KN-62 ist vorallem bekannt als Rattenhirn-Calmodulinkinase-Inhibitor, aber ist auch beschrieben als Inhibitor des humanen P2X₇-Rezeptors mit einem IC₅₀ = 100nM. Die Inhibitionsstelle des KN-62 befindet sich im Bereich der Bindestelle des Calcium-Calmodulins am Enzym.

Verschiedentlich konnte gezeigt werden, dass die Calcium-Calmodulinkinase eine wichtige Funktion bei Lernprozessen durch Potentierungsvorgänge im Rattenhirn spielt, wie bei (R,S)-3,5-Dihydroxyphenylglyzin, einem Aktivator Typ-I-metabotroper Glutamatrezeptoren, induzierter Langzeitdepression in der CA 1-Region des Hippocampus, die KN-62-sensitiv [10µM] sind (Schnabel, R. et al. 1999 und Wilson et al., 1997, 1999).

Speziell in Makrophagen spielt die Calcium-Calmodulinkinase eine wichtige Rolle bei verschiedenen frühen Transmembran-Signalereignissen. Die CaCAMK der Makrophagen ist wesentlicher Bestandteil eines komplexen Netzwerkes des Phospholipidmetabolismus', Ionentransport- und Ionenstrom-Aktivitäten, Erzeugung zyklischer Nukleotide und regulatorischer Protein-Signalübertragungs-Systeme *durch* Nukleotide. Eine Aktivierung der Calcium-abhängigen Form der Calmodulinkinase kann geschehen einerseits über Liganden-abhängige Aktivierung von membranständigen Rezeptoren, die über trimere G-Protein-Kopplung an Phoslipasen C, D oder A₂ über hydrolytische Erzeugung von Lipidsubstraten aus Phosphatidylinositol-diphosphat (PIP₂), Phosphatidycholin und Spingomyelin, IP₃ (das Calcium aus intrazellulären Speichern und Endosomen über einen spezifischen Rezeptor freisetzt), Diacylglycerol (dem vornehmlichen Stimulus der Proteinkinase C, PKC) und Lysophosphatidylsäure und Phosphatidylsäure, nebst Aktivierung des Arachidonsäuremetabolismus und Prostaglandinsynthese und Leukotriensynthese führt, wie es bei Makrophagenaktivierung nach bakteriellem Lipopolysaccharid der Fall ist (vgl. Hamilton et al. In: the Macrophage-pathogen interactions, Hrsgb. Zwilling & Eisenstein).

In dieses komplexe Netzwerk sind auch Ionenverschiebungen und Ionenflüsse durch Calciumkanäle, bei Makrophagen vorallem spannungsabhängige Calciumkanäle, Calcium-release-aktivatet-channels (CRAC) und solche, die nach Ligandenbindung aktiviert werden, wie etwa das System purinerger Rezeptoren, involviert.

Proteinkinase C und Calmodulinkinase-Übertragungswege sind von zentraler Bedeutung bei der Makrophagenaktivierung nach LPS und der Induktion der proinflammatorischen Cytokins IL-1 sowie in der Aktivierung verschiedener Proteinkinasen.

An die Calciumcalmodulinkinase binden viele verschiedene Proteinsysteme und regulatorische Enzyme oder werden durch diese reguliert (#):

System:	Funktion:	Bindungskonstante: (sofern bekannt)	Literaturquelle:
* Calciumcalmodulin***	Aktivierung der Calcium-calmodulinkinase	$10^{-9}M$	Arbuzova et al.
* G_{β} (PLC), β -Untereinheit	Aktivierung durch		Arbuzova et al.
* MARCKS	Inaktivierung		Arbuzova et al.
* einige der 8 Isoformen der Adenylatzyklase	cAMP-Bildung		Bhalla, U.S. und Iyengar, R.
* $P2X_7$ (?)	Regulation der Phospholipase D(?) KN-62-sensitiv !		Ralevic, V. und Burnstock, G.
* N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA, Untereinheit NR1)	Inaktivierung		Arbuzova et al.
* Phosphodiesterase I	Aktivierung zum cAMP/cGMP-Abbau		Essayan, D.M.
* <i>Phosphokinase A</i>	<i>Aktivierung, dadurch</i>		<i>Stryer, Wellhöner</i>
# LPS induziertes IL-1	Troponin 1-Phosphorylierung Induktion		Eisenstein, Zwilling

*** = auch Phosphorylase-Kinase

Calmodulin ist ein kleines, saures, ausgesprochen stabiles Monomer mit vier Calciumbindungsstellen und einer Molmasse von etwa 15 bis 19kDa, ohne Cystein, Hydroxyprolin und Tryptophanreste, sowie nur wenig Tyrosin. Es enthält außerdem einen vollständig trimethylierten Lysinrest.

Die vier Bindungsstellen für Calcium sind in vier Domänen angelegt, die als EF-Motive (Helix-Schleife-Helix) organisiert sind (Stryer, 1988, MacMicking et al., 1999).

Ein Peptid der 28-32kDa und Substrat gleichermassen der nach Phospholipase C (PLC) aktivierten Proteinkinase C (PKC), MARCKS, zirkuliert zwischen Cytosol und einer membranständigen Form. In letzterer ist es unter anderem Target für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C an drei Phosphorylierungsstellen und wird mit hoher Affinität vom Calciumcalmodulin membranständig gebunden ($K_M = 10^{-9}M$) und aus der Membran entfernt.

Unter anderem ist dieses Protein auch auf der Membran verschiedener Vesikel vorhanden und spielt eine Rolle bei sekretorischen Vorgängen.

Obschon die Funktion dieses Peptides noch nicht vollständig geklärt ist, erfüllt es offensichtlich eine Funktion der Inhibition der IP_3 -Generierung durch die Phospholipase C in vielen verschiedenen Zelltypen, wie etwa in der IC 2-Mastzell-Linie (Arbuzova, A. et al., 1998) und verstärkt hier die rezeptorvermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase.

1.2.6 zyklische Nukleotide und zelluläre Phosphodiesterasen:

Die Erzeugung und Entstehung von zyklischem cAMP bei Makrophagen wird heute überwiegend als ein protektives oder reprimierendes Signal bei der Aktivierung mononukleärer Phagozyten angesehen. Einige bei der Zellaktivierung rekrutierte Signalübertragungswege sind blockierbar, sofern eine gleichzeitige Behandlung der Zellen erfolgt, die mit einer Elevation des zytosolischen cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) einhergeht, wie etwa die induzierte Expression von MHC Klasse II-Molekülen nach Interferon- γ , tumorizidale Makrophagen-Aktivität und die Produktion verschiedener vor allem proinflammatorischer Cytokine wie TNF- α und dem Makrophagen-chemotaktischen Protein 1, MCP 1 (Hamilton in Eisenstein, Zwilling: Macrophage Pathogen interactions, 1994, Gantner et al., 1997 I), sowie die Expression des ionotropen ATP-Rezeptors P2X₇ (Humphreys, Dubyak, 1998).

Die zellulären Phosphodiesterasen sind kritisch für die Kontrolle der Spiegel von cAMP und cGMP nach Aktivierung der Adenylat- und Guanylatzyklasen. Diese wiederum sind für die Regulatoren einer Reihe von zellulären Mechanismen, Ionenkanälen, Rezeptoren und der Stickstoffoxydsynthese verantwortlich. Obwohl die Phosphodiesterasen selber durch die iNOS nicht beeinflusst werden, sind die Spiegel der zyklischen Nukleotide entscheidend auch von der iNOS reguliert.

Die Phosphodiesterasen umfassen eine Familie bestehend aus sieben Mitgliedern.

Heute kennt man vor allem die anti-inflammatorische Aktivität von zyklischem Adenosinmonophosphat, cAMP und Phosphodiesterase-Inhibitoren, deren spezifische Aktivität an Mitgliedern einzelner der sieben verschiedenen Familien heute Gegenstand intensiver Forschung ist. Während bei Monozyten vor allem PDE 3 und 4 exprimiert werden, in einem quantitativen Verhältnis von 1:5, sind die Level bei älteren Zellen auch in Kultur in etwa gleich. Die Phosphodiesterase 4, deren Expression vor allem bei Monozyten sehr hoch ist und ab 48h in Kultur abnimmt, spielt eine entscheidende Rolle bei der LPS-induzierten Signalübertragung, die zur TNF- α -Freisetzung führt: selektive PDE 4-Inhibitoren (z.B. Rolipram) inhibieren bis zu 80 % den Spiegel des Entzündungsmediators in Kultur durch erhöhte cAMP-Spiegel in den Zellen, während PDE 3 weniger aber PDE 1-Inhibitoren vollkommen wirkungslos sind.

Ab der zweiten Woche in Kultur werden diese aber ebenfalls in etwa gleichen Aktivitäten nachgewiesen, während PDE 2 und 5 praktisch nicht gefunden werden (Essayan, D.M. 1999, Gantner, F. et al., 1997).

Alle Familien der Phosphodiesterasen sind das Produkt einer unterschiedlichen Anzahl von Genen (1 bis 4), und werden unterschiedlich reguliert bzw. aktiviert:

die in Makrophagen beschriebenen Phosphodiesterasen 1 sind Calcium/ Calcmodulin-stimuliert und zeigen K_M -Werte für cAMP von 1-30 μ M und für cGMP = 3 μ M. Die Phosphodiesterasen der Familie III werden durch cGMP inhibiert, zeigen eine cAMP-Spezifität (cAMP \gg cGMP) und weisen K_M -Werte für cAMP von 0.2 μ M gegenüber 0.3 für cGMP auf. Während PDE 4 ebenfalls cAMP-spezifisch sind, sind sie für cGMP weitgehend insensitiv [$K_M = 4\mu$ M vs. K_M (cGMP) > 3000 μ M]. Die PDE 5 wird cGMP-spezifisch aktiviert: K_M (cGMP) = 1 μ M gegenüber $K_M = 150\mu$ M (cAMP). PDE 2, 6 und 7 sind in Makrophagen nicht beschrieben.

Vor allem Phosphodiesterase 4- Inhibitoren (und Prostaglandin E_2) verhindern proinflammatorische Effekte von Lipopolysaccharid über die Elevation des zytosolischen cAMP-Levels, dh. die TNF- α – Freisetzung und Lymphotoxin-Entstehung, Leukotrien B_4 und C_4 -Entstehung und verringerte Phagozytose, aber nicht die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, die Freisetzung von Interleukinen 6 und 8, und vor allem nicht die NO-Erzeugung durch die Stickstoffoxydsynthase.

Die Enzymaktivität von Typ II und Typ III wird direkt von cGMP an nicht-katalytischen konservativen Bindestellen reguliert.

Durch hohe Level an zyklischen Nukleotiden werden cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen, vor allem die Proteinkinase A in die aktive Form überführt. In der Konsequenz kommt es zur Proteinphosphorylierung und damit zur Aktivitätsveränderung von Ionenkanälen, Tyrosinkinasen und weiteren Proteinkinasen (Essayan, D.M., 1999).

1.3 bovine chromaffine Zellen:

Medulläre chromaffine Zellen des Nebennierenmarks wurden erstmalig 1903 von Kohn beschrieben. Sie sind seither Gegenstand intensiver Studien, da sie sich akut dissoziiert sehr einfach kultivieren lassen, elektrophysiologisch leicht charakterisierbar sind und für neuro-humorale Releasevorgänge ein ideales Repertoire an Eigenschaften besitzen: sie sind elektrisch erregbar, haben ein breites Repertoire an Ionenleitfähigkeiten und sind endosekretorisch (Lara et al., 1997, I, II und III, Twitchell, W.A. 1997, Weinsberg et al., 1994, Ranriamampita und Tsien, 1993).

Über die Regulation des Calciumhaushaltes in chromaffinen Zellen hat man heute sehr genaue Vorstellungen (Artalejo, A., Garcia, A., Neher, E. et al., 1993, Holda et al., 1998).

Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks sezernieren hauptsächlich Adrenalin und in kleineren Mengen Noradrenalin und Dopamin (Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Kapitel 2).

Die Terminologie geht zurück auf eine Färbung dieser Zellen bei pH 6, bei dem das jeweilige Amin oxidiert wird und Chromat spezifisch als phenolische und Indol-Komplexe gebunden wird.

Eine positive Färbereaktion ergibt sich auch bei Mast-Zellen durch deren 5-Hydroxytryptamin-Gehalt sowie bei enterochromaffinen Zellen.

Somit ergibt sich für diese Zellarten auch eine gewisse physiologische Nähe, wenn auch die Entwicklung der immunkomptenten Mastzellen aus den Knochenmarksvorläuferzellen und der chromaffinen Zellen aus dem Neuroektoderm, ohne Zwischenverschaltung im Grenzstrang des Sympathicus völlig verschieden verläuft.

Ogleich Adrenalin viele metabolische und zirkulatorische Effekte ausüben kann, bleibt die Zerstörung der Nebennieren infolge von Krankheitsprozessen oder bilaterale Adrenalectomie meist ohne Adrenalinmangel-Symptome und ist mit Hydrocortison und Mineralokortikoiden behandelbar (Hierholzer, Schmidt, 1991).

Über sympathische Neurone des peripheren Nervensystems angesteuert, schalten die von den chromaffinen Zellen freigesetzten Katecholamine im Wesentlichen die Funktionszustände des Körpers endokrin um, das heißt die vasoaktiven und modulatorischen Effekte an Myozyten, Aktivierung der Glykogenolyse und Hemmung der Insulinsekretion an den pankreatischen β -Zellen stehen im Vordergrund der Aktionen.

Verschiedene (Pro-) Peptidhormone des endokrinen Systems wie Pro-Opiomelanokortin, Adenocorticotropes Hormon (ACTH = Corticotropin), β -Endorphin, Vasopressin und Oxytocin beeinflussen die Freisetzungsvorgänge von Nebennierenmark- und -rindenhormonen.

Klinisch relevante Erkrankungen des Nebennierenmarks sind vorallem das Phäochromocytom, das Shy-Drager-Syndrom und das Lesch-Nyan-Syndrom, sowie im Zusammenhang mit Erkrankungen des autonomen Nervensystems das Riley-Dray-Syndrom oder Neuropathien des

Sympathicus bei Diabetes mellitus.

Phäochromozytome sind zu 90% der Fälle auf Nebennierentumore beschränkt, zu 10% der sympathischen Paraganglien (Hierholzer/Schmidt, 1991).

Ausgelöst durch eine kontinuierlich erhöhte oder schubweise erfolgende Sezernierung von Adrenalin resultiert aus dem Katecholamin-Wirksamkeitsspektrum eine bizarre Symptomatik, mit einem exzessiven Anstieg des arteriellen Blutdrucks, während die Herzfrequenz durch Barorezeptoren gesteuert, Noradrenalin vermittelt absinkt, im Falle der gesteigerten Adrenalinsekretion Herzklopfen, Tachykardie, starkes Schwitzen und Zittern, erhöhtem Blutdruck verbunden mit einem Hypermetabolismus, einem sekundären Diabetes mellitus und zur Gewichtsabnahme.

Diese pathologischen Veränderungen stehen nach PCB-Intoxikation aber nicht im Vordergrund. Obwohl nicht-koplanare polychlorierte Biphenyle zu einer gesteigerten Spontanrelease an Katecholaminen führen (Messeri et al., 1997, bovine chromaffine Zellen), ist eine Symptomatik kaum feststellbar, oder resultiert, wie in bestimmten Kohorten beobachtet wurde, wie etwa der Michigan-Population, in einer Hypotonie, die einer erhöhten Spontanrelease entgegengespricht.

Damit gelten diese eher als endokrine Disruptoren der Neuro-sekretorischen Kopplung und sind vor allem im Zentralnervensystem problematisch in Bezug auf Kurzzeit-Gedächtnisleistungen und führen bei pränataler Exposition zu neurologischen Entwicklungsdefiziten und veränderten Lernleistungen bei Kindern (Winneke et al., 2000), sowie im tierexperimentellen Modell zu verzögerten Wahlreaktionen.

Somit haben Studien zur Störung der Katecholaminsekretion an Zellen des Nebennierenmarks vor allem Modellcharakter für sympathische ~ und zentralnervöse Störungen.

1.3.1 Klinische Aspekte gestörter Katecholaminsekretion:

In den letzten dreißig Jahren wurde das Gebiet der Rolle von Monoaminen bei psychischen Störungen, Schizophrenie und Parkinson intensivst erforscht.

Von besonderem Interesse sind toxische und medikamentös ausgelöste Formen des Parkinson-Syndroms, beispielsweise nach Kohlenmonoxyd- und chronischer Manganintoxikation, nach dem Meperidin-Analog MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridin), das nach endogener MAO-B (Monoaminoxidase B)

Verstoffwechslung durch Astrozyten zum Pyridinium-Analog MPP⁺ zu einem Untergang (dying back der Axone) dopaminergener Neurone führt.

Desweiteren kennt man heute metabolisch ausgelösten sekundären Morbus Parkinson (Morbus Wilson, Hypoparathyreodismus, bei dem auch die PCBs eine Rolle spielen, s. Einleitung), Tumoren, Kopftraumen und verschiedenen degenerativen Multisystem-Atrophien wie striatonigrale Degeneration, progressiver supranukleärer Lähmung und dem bereits erwähnten Shy-Drager Syndrom (infolge orthostatischer Hypotonie).

Nach wie vor wird der klinische Morbus Parkinson, dem eine gestörte Dopaminsynthese durch Degeneration der Basalganglien (ventromedial tegmental-Läsionen im Tiermodell führen phänotypisch zur verminderten Dopasynthese im Striatum, Goldstein et al. 1964, in: Hefter, Heubner (Editoren): Catecholamines) zu Grunde liegt, mit L-Dopa-Gabe und Hemmern der Monoaminoxidasen (MAO) und Dopa-Decarboxylase pharmakologisch behandelt.

Der Untergang der pigmentierten Dopaminneuronen der Pars compacta der Substantia nigra, der dorsalen motorischen Kerne des Vagus und des Locus coeruleus ist beim Parkinsonismus verantwortlich für die Dysregulierung der striatalen Dopaminsynthese. Etwa 70 bis 80% untergegangene Neurone führen erst zum klinisch manifesten Morbus Parkinson. Neueren Untersuchungen zufolge sind auch andere Transmittersysteme beeinträchtigt, wie Noradrenalin, Serotonin und GABA (Hornykiewicz O, in: Marsden et al., movement disorders, Butterworth; London). Das Aktivitätsgleichgewicht ist zugunsten eines cholinergen Übergewichts verschoben, das mit Anticholinergika behandelt wird.

Auf dem Gebiet der Frühdiagnostik stehen vor allem zelluläre Zerfallsmarker im Mittelpunkt des Interesses, wie GFAP der geschädigten Glia, das im Liquor nach Rückenmarkspunktionen nachweisbar ist.

Für die polychlorierten Biphenyle werden im Zusammenhang mit dem Morbus Parkinson vor allem sekundäre Mechanismen diskutiert, wie etwa eine Schädigung der Thyroidea (Goldey et al. 1995), oder im Zusammenhang mit neurotoxischen Einflüssen auf die Glia: Die Synthese und Membranzusammensetzung der Sphingolipide, Sphingomyeline, die bei Nervenzellen zur Bildung der Myelinscheide beitragen und Glykosphingolipide der grauen Hirnsubstanz ist nach 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl gestört. Eine veränderte Expression von cholinergen muskarinischen Rezeptoren in Nagern wird nach Exposition mit 2,4,4' Trichlorobiphenyl, 2,2',4,4'-Tetra-chlorobiphenyl und 2,2',5,5' TCB, die aus den Hirnregionen isoliert wurden und auch in anderen Geweben persistent sind, beobachtet.

Desweiteren sind verschiedene neuronale Parameter PCB-abhängig gestört, wie etwa GABA_A-Rezeptor vermittelte Calcium- und Chlorid-Antworten während der Reifung in vitro von neocorticalen Zellen des Rattenhirns (Inglefield, J.R und Shafer, T.J., 2000) und die Excitations-Sekretionskopplung ab etwa 10µM PCB 47 (2,2',4,4') in den Neuronen der CA1-Region des Hippocampus im Rattenhirn. Die diortho-substituierten PCB-Kongeneren führen bei den verschiedenen neuronalen Zelltypen bereits nach akuter Applikation zu einem starken Calciumeinstrom über der Extrazellulärmembran (Tim Schafer et al., 2000, in press).

1.3.2 Calcium-Antagonisten:

Von den verschiedenen Typen von spannungsaktivierbaren Calciumkanalproteinen auf humanen aber auch verschiedenen Geweben der meisten Vertebraten, N-, P-, K- und L-Typ ist nur der

letztere, der 'lang-andauernde, hochspannungsaktivierte (long-lasting-high-voltage-activated)'-Proteinkomplex aus mehreren Untereinheiten sensitiv für Inhibitoren aus der Gruppe der Calciumantagonisten der Dihydropyridine, deren Leitsubstanz das Nifedipin ist und das, da gefäßprävalent, in der Pharmakotherapie als Antihypertonikum eingesetzt wird.

Daneben existieren noch sogenannte kationisch-amphiphile Substanzen, wie Verapamil, ein Phenylalkylamin und Diltiazem, ein Benzodiazepin, die Gefäß- und Herzprävalent sind.

Diesen Calcium-Antagonisten ist gemeinsam, dass ihre Bindestelle an der α_1 -Untereinheit, der Ionenpore liegt, wenn auch die Bindestellen an deren vier Domänen verschiedene sind.

Dihydropyridine wie Nifedipin sind besonders wirksam an der glatten Gefäßmuskulatur des arteriellen Schenkels. Die Dihydropyridin-Bindestelle an der α_1 -Untereinheit befindet sich im nach extrazellulär gewandten Bereich des Kanalproteins. Die Affinität der Bindung ist höher bei L-Typ-Kanälen im inaktiven Zustand. Mittlerweile ist Nifedipin in etwa 20 weiteren Handelsnamen und 10 weiteren Generika auf dem Markt.

PN-110/200 ist ein strukturell dem Nifedipin sehr eng verwandtes Dihydropyridin, bei dem ein Benzolring durch einen Heterozyklen, ein Adeninderivat, substituiert ist (Lara et al., 1997, Shafer et al., 2000, Lüllmann/Mohr).

2 Fragestellung:

Im Sinne pharmakologischer Prinzipien ist man stets gebunden, Wirkungen von Xenobiotika auf der Grundlage zellulärer Matrices zu ermitteln, wie etwa Zelltyp, exprimierter Gene und -speziell bei Makrophagen- dem Aktivitätsmuster und Aktivierungszustand einerseits und Entwicklungsfenster eines Organismus, eines Organs oder einer Zelle andererseits.

Demnach sind, wie aus der Einleitung deutlich wird, die beobachtbaren Wirkmuster der polychlorierten Biphenyle bei verschiedenen Zelltypen oder gar komplexeren experimentellen Systemen verschieden.

Die mitunter vielschichtigen zu beobachtenden Muster der Beeinflussung zellulären Stoffwechsels lassen im Sinne evolutionstheoretischer Überlegungen aber erwarten, dass biologisch entstandene Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen durch Xenobiotika auf molekularer Ebene nachgeahmt werden (sogenannte molekulare Mimikry). Das bedeutet, dass ein enger Zusammenhang besteht zwischen Struktur eines Stoffes und seiner biologischen Funktion oder einer toxischen Substanz und ihrer biologischen Wirkung.

Diejenigen zellulären Systeme, die durch Expositions- respektive Aufnahmepfad relevant toxischen Substanzen ausgesetzt sind, werden gemäss des Wirkortes einer toxischen Substanz anhand ihrer Protein- und enzymatischen Ausstattung über das vornehmliche Wirkprinzip entscheiden.

Koplanare polychlorierte Biphenyle, die aufgrund höheren Chlorierungsgrades (Tetra-, Penta- und Hexachlorobiphenyle) nicht effizient verstoffwechselt werden und lange Halbwertszeiten aufweisen, beeinflussen den zellulären Stoffwechsel überwiegend Aryl-Hydrocarbonrezeptor-vermittelt, da der Rezeptor seinerseits nahezu ubiquitär exprimiert wird.

Bei den nicht-koplanaren, orthochlorierten Biphenylen unterscheiden sich die Wirkungen mono- und diorthochlorierter Kongenere.

Generell sind die Mechanismen der beeinträchtigenden Veränderung der orthochlorierten PCBs sowohl bei Organsystemen wie auch bei Neuronen aber nicht AH-Rezeptor gebunden, sind aber oftmals Phenobarbital-ähnliche Cytochrominduzierer mit im Tierversuch tumorpromovierenden Eigenschaften.

Die bereits beschriebenen akuten Veränderungen der zytosolischen Calciumspiegelerhöhung bei Mastzellen und neuronalen Zellkulturen lassen nicht unbedingt einheitliche Muster erkennen.

Darüberhinaus weiß man bislang sehr wenig über die Mechanismen der Beeinflussung des Stoffwechsels und die toxikologischen Wirkmechanismen diorthochlorierter Kongenere. Vorallem sind bislang keine Humanen-Biomonitoring-Werte bekannt, weder für Gemische noch für Einzelkongenere.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand des beispielhaft gewählten diorthochlorierten 2,2',4,4' Tetrachlorobiphenyls (PCB 47),

-
- (1) an aus Primärblut aufgereinigten Humanmakrophagen zunächst die akute Beeinflussung des zellulären Stoffwechsels zu studieren
 - (2) anhand des zytosolischen Calciumspiegels, dessen Regulation allgemeiner Ausdruck komplexer Regelmechanismen anzusehen ist, Rückschlüsse auf Veränderungen von daran gekoppelten Signalübertragungswegen zu erhalten
 - (3) durch Ermittlung von Zielproteinen für das PCB 47 im Vergleich zu dem koplanaren PCB 77 Struktur- Wirkungsbeziehungen und
 - (4) Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu erstellen
 - (5) sowie mechanistische Aussagen zur PCB 47-Konzentration und Relevanz an einem humanen zellulären System ohne Übertragbarkeitsfrage zu erhalten.
 - (6) Desweiteren sollte geklärt werden, welcher Mechanismus der bekanntermaßen neurotoxischen PCB 47- Wirkung der erhöhten Catecholaminfreisetzung Aryl-Hydrocarbonrezeptor unabhängig bei neuronalen Zelltypen am experimentellen System der bovinen chromaffinen Zelle zu Grunde liegt.
 - (7) Aussagen zu relevanten Konzentrationen aus tierexperimentellen Studien bei der Übertragbarkeit auf den Menschen zu treffen.

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurden exemplarisch zwei verschiedene Zelltypen ausgewählt: zum einen, als immunkompetente Zellen menschlichen Ursprungs aus peripheren Blutmonozyten abgeleitete Humanmakrophagen, die im Wesentlichen die Übertragbarkeit der Aussagen aus Experimenten mit äquivalenten nicht humanen mammalischen Zellen garantieren, zum anderen bovine chromaffine Zellen, die ihrem Ursprung nach mit Eigenschaften sowohl neuronaler als auch endokriner Zellen ausgestattet sind.

In dieser Arbeit soll demonstriert werden, dass äquimolare Konzentrationen eines Xenobiotikums anthropogenen Ursprungs, des PCB 47, auf zwei voneinander unabhängige zelluläre Mechanismen auf verschiedenen Zelltypen für den zellulären Stoffwechsel relevant zurückwirken.

Die Zellen unterscheiden sich strukturell, morphologisch und funktionell und es soll versucht werden, zu verdeutlichen, dass letztendlich die enzymatische Ausstattung einer Zelle, der Grad der Exposition und zelluläre Funktionszusammenhänge über das Ausmaß, den Wirkmechanismus und das Wirkortprinzip auf dieser Ebene entscheiden.

3. Materialien und Methoden:

3.1 Zellkultur humaner, von mononukleären Phagozyten abgeleiteten Makrophagen:

Das Prinzip der Herstellung einer Zellkultur aus humanen mononukleären Phagozyten, den Vorläufern der residenten Gewebemakrophagen und zirkulierenden Makrophagen im Blut beruht auf einer Auftrennung zunächst nach ihrer Größe über einen Dichtegradienten und -nach Ausplattieren- auf ihrer Adhärenz am Zellkulturschalenboden bzw., den Glasmaterialien im Gegensatz zu Erythrozyten bzw. B- und T-Lymphozyten, die nicht an unbeschichteten Kulturgefäßen adhäreren.

Unter sterilen Bedingungen wurde humanes heparinisieretes Vollblut, erhalten von der Blutbank der Universität Düsseldorf, 50 ml pro Präparation, mit Dulbeccos PBS ohne Calcium und Magnesium auf 160 ml vorverdünnt.

Je 20 ml Ficoll-Dichtegradientenzentrifugationsmedium $\zeta = 1.077$ [mg/ml] wurden mit 20 ml vorverdünntem Blut in 50ml Falcon-Röhrchen überschichtet und bei 1200rpm in einer Sovallzentrifuge aufgetrennt, die Lymphozytenbande mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal in 50 ml PBS durch Zentrifugation bei 1200rpm gewaschen (Methode beschrieben bei Seemayer, 1987).

Anschließend wurde die Zellzahl im Durchflußcytometer ('Coultercounter') oder in der Neubauerzählkammer bestimmt.

Ohne Berücksichtigung der partiell als Verunreinigung noch enthaltenen Erythrozyten wurde die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen pro ml in RPMI 1640 Komplettmedium [mit 8% Fötalem Kälberserum, FCS, 2% Neugeborenen Kälberserum, NCS, 1% inaktiviertem humanen AB-Antiserum, 1% Penicillin/Streptomycin] eingestellt und auf unbeschichtete Glasplättchen in Greiner 4ml Zellkulturschalen für Calciumspektrofluorimetrie-Versuche, 2ml Greiner Zellkulturgefäße für patch-clamp-Ansätze sowie unbeschichteten 96 well-Mikrotiterplatten für Cytokinfreisetzungsexperimente und Bestimmung der zyklischen Nukleotide (Fa. Falcon/ Beckton-Dickinson) ausgebracht.

Nach zwei Tagen in Kultur wurde das Kulturmedium gewechselt, sodass noch enthaltene nichtadhärente Lymphozyten aus der Kultur entfernt wurden. Am sechsten und neunten Tag wurde das Medium ebenfalls gewechselt, am zwölften Tag in Zellkultur wurden 2ml Kulturmedium zugefüttert. In den 96er Mikrotiterplatten wurden 2×10^5 Zellen eingesetzt, das Medium im selben Rhythmus gewechselt und zusätzlich 24h vor Durchführung der Bestimmung der zyklischen Nukleotide.

In allen aufgeführten Experimenten wurden Tag 7-14 alte Zellen verwendet.

Die Zellen ließen sich mit der verwendeten Methode mindestens 30 Tage kultivieren.

Alle sterilen Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank (BSB 6A der Firma Gelaire Flow Laboratories) mit sterilisierten Arbeitsmaterialien durchgeführt.

3.2 Zellkultur boviner chromaffiner Zellen:

Bei den in den Versuchen verwendeten Zellkulturen handelte es sich ausnahmslos um Primärkulturen chromaffiner Zellen aus dem Nebennierenmark von Rindern. Die Präparation und Kulturmethoden wurden nach einer Vorschrift aus dem Pharmakologischen Institut der Universität zu Giessen (Leitung: Prof. Ernst Habermann) durchgeführt.

Durchführung der Präparation:

Im Düsseldorfer Schlachthof wurden mehrere Nebennieren aus frisch geschlachteten Rindern entnommen und möglichst direkt vom umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit. Die freipräparierten Nebennieren wurden mehrmals über die Vene mit 4°C kaltem, sterilem Hepespuffer (im Folgenden als 'S-Puffer' bezeichnet), gespült. Dieser Schritt war, wie sich bei verschiedenen Präparationen gezeigt hat, besonders kritisch, da die enthaltenen Blutreste und Erythrozyten viel Kalium enthalten und bei Zerplatzen durch Depolarisation im Gewebe zu einem massivem Katecholaminrelease führen können, der als wichtiger neuropharmakologischer Parameter unter PCB-Einfluß in unserem Labor bestimmt wird (in Ergänzung zu den hier beschriebenen Versuchen zur Elektrophysiologie und fluoreszenzoptischen Verfahren zur Bestimmung des Calciumgehaltes in den Zellen) und die Zellvitalität beeinträchtigen kann.

In einer Eisbox ins Institut transportiert, wurden die Nebennieren zunächst mit 70% Ethanol von außen gereinigt, um etwaige Pilze oder Bakterien zu entfernen.

Nach zwei weiteren Spülschritten mit S-Puffer (37°C) über die Hauptvene wurden die Nebennieren mit 3ml pro Nebenniere sterilfiltrierter Kollagenaselösung mehrmals unter leichtem Fingerdruck durchspült und im letzten Schritt durch Abschnüren des Venenkragens mit einem Nylonfaden über der Injektionsspritze mit drei Milliliter Kollagenaselösung gefüllt und bei 37°C in einem sterilen Becherglas im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Nebennieren in einer Petrischale durch einen Longitudinalschnitt aufgetrennt, die beiden Hälften auseinandergeklappt und das jetzt durch den Kollagenaseandau aufgeweichte Nebennierenmark mit einer sterilen Rundschere in die Petrischale gekratzt.

Zur weiteren Vorvereinzelung der Zellen wurde nach Zusatz von 1 ml Kollagenaselösung das Mark mittels Schere weiter zerkleinert, in 14 ml Kollagenaselösung in einem Falcon-Röhrchen überführt und wiederum eine Stunde bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Diese beiden Präparationsschritte sollen dazu führen, dass die chromaffinen Zellen von den Bindegewebsresten entfernt werden und die Zellen möglichst vereinzelt dargestellt werden.

Anschließend wurde die Zellsuspension, über ein auf ein 50ml Falcontube aufgelegtes Feinsieb (0.4mm) mit Hilfe eines Glaspistills gedrückt, von größeren Bestandteilen und Zellklumpen aufgereinigt.

Zur Entfernung der restlichen Kollagenaselösung wird die Zellsuspension anschließend bei 700 rpm im 50ml Falconröhrchen abzentrifugiert, das Pellet mit einer Pasteurpipette Tropfenweise unter Schütteln in 20ml einer vorgelegte PBS-Waschlösung resuspendiert und wiederum bei 700rpm abzentrifugiert.

Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt.

Nach Resuspendierung wurde das Pellet in 10ml Zellkulturmedium aufgenommen, eine Trypanblaufärbung durchgeführt und in einer Neubauerzählkammer gezählt, auf eine Zellzahl von 0.5×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt und auf mit 2 % Rattenschwanzkollagen-beschichteten Glasplättchen in 2 ml Zellkultur-petrischalen für patch-clamp-Versuche oder 4ml Kulturschalen für Calciumspektrofluorimetrie-Ansätze ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ über bis zu fünf Tage gehalten.

Länger als über den angegebenen Zeitraum sind die Zellen ohne weiteres nicht kultivierbar. Innerhalb von drei Tagen in Kultur ändern die nach Ausbringen runden Zellen ihr Erscheinungsbild über einen zunächst spindelförmigen Habitus hin zu letztlich trapezartigem Zellkörper.

3.3 Kulturmedien und Zellvitalitätsprüfungen:

3.3.1 Medien:

Spezifikation der Seren für die Zellkultur:

Kälberseren:

Fötale- und Neugeborenen-Kälberserum (FCS und NCS) waren nach Herstellerangaben (Fa. Biochrom) wie folgt spezifiziert:

negativ getestet auf mikrobielle Sterilität: Bakterien und Pilze (Thioglykolat), Tryptone SoYa Broth, Sabourand, Mycoplasmen und bakterielle L-Formen, Cytopathologie- und Hämabsorbtions-Virustest, Rindervirusantikörper (Titer): BVD-MD (1:2), IBR-IPV (<1), PI 3 (<1:5)

Zellwachstumtest: relative Aussaataktivität bei Syrischen Hamsternierenzellen, 100% der

Kontrolle, Kontrolle in RPMI 1640/10, 20% &S05, FCS

chemisch/physikalische Analysen:

Fötale Kälberserum (Chargenbezeichnung:7 F 05):

Neugeborenenkälberserum (Ch.B.: 110E):

pH-Wert	7.37	7.51
Osmolalität	0.317 Osm	0.311 Osm
Gesamtproteine	33 g/l	35 g/l
Hämoglobin	32 mg/100ml	29 mg/100ml
Glucose	136 mg/100ml	77 mg/100ml
Endotoxin	150 EE/ml	108 EE/ml
Ursprungsland	Chile	dto.

Kulturmedien:

Makrophagen:

RPMI 1640 Komplettmedium
verstezt mit 8% FCS (fötalem Kälberserum, Fa. Biochrom)
2% NCS (Neugeborenen-Kälberserum, Fa. Biochrom)
1% inaktiviertes humanes AB-Antiserum
1% Penicillin/ Streptomycin]
5% Glutamin
pH 7.3

Chromaffine Zellen:

Kulturmedium:

10g/l Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 33mM Glucose, 36mM NaHCO₃, 7mM Glutamin,
10% fötales Kälberserum (FCS), 10µM Uridin, 10µM Zytosinarabinosid, 100 Units/ml Penicillin,
100µg/ml Streptomycin, pH 7.2

Hepes-Puffer ('S-Puffer'): 150mM NaCl, 5mM KCl, 10mM Glucose, 10mM (N-2-Hydroxyethyl)-
Piperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES)

pH-Wert 7.4

Kollagenase-Lösung: Kollagenase (Fa. Serva von Clostridium histolytikum, lyophilisiert 0.98 PZ
U/mg) 24 mg / 40ml S-Puffer pro Nebenniere

alle anderen Chemikalien und Medien wurden von kommerziellen Firmen wie Sigma, Fluka, Riedel
de Haen, Boehringer, Merck, BioRad, Biochrom und Gibco bezogen.

Alle Zellkulturen wurden im Brutschrank (Fa. Heraeus CO₂-Auto-Zero), bei 37°C und 5% CO₂ in
luftfeuchter Atmosphäre gehalten.

3.3.2 Zellvitalitätsprüfungen:

Als gängige Testverfahren zur Bestimmung der Zellvitalität werden derzeit drei verschiedene gängige Testverfahren verwendet: der Trypanblautest, der Mitochondriale Tetrazoliumtest (MTT) und der fluorimetrische NADPH-gekoppelte Lactatdehydrogenase-Freisetzungstest.

(a) Trypanblautest:

Als Schnelltest für Vitalität der verschiedenen Zelltypen wurde während der Präparation ein Trypanblautest durchgeführt. Prinzip dieses Tests ist der Ausschluß des Farbstoffs durch vitale Zellen nach Aufnahme. Zellen, deren Membranintegrität verletzt ist, können den Farbstoff nicht mehr effizient gegen den Konzentrationsgradienten aus ihrem Zytoplasma aktiv entfernen und bleiben gefärbt.

Verwendete Lösungen und Durchführung:

Trypanblau wurde im Test in einer Endkonzentration von 0.18% in Dulbeccos Phosphat-gepufferter Saline ohne Calcium und Magnesium eingesetzt.

Die Zellsuspension wurde dazu 1:100 (100µl auf 10ml) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in einer Neubauer Zählkammer gezählt und gleichzeitig die Vitalität bestimmt. Bei adhärennten Zellen (etwa zur Bestimmung der Zellvitalität nach Schadstoffbehandlung) wurden diese mechanisch vom Kulturgefäßboden entfernt, 5 Minuten bei 1000rpm abzentrifugiert, in 10 ml Dulbeccos PBS aufgenommen, wiederum 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert (um das restliche Serum zu entfernen, das den Test stört), in einem definierten Volumen PBS/Trypanblau aufgenommen und nach Resuspendieren und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur ein Aliquot bei 20 facher Vergrößerung in der Zählkammer quantifiziert.

Trypanblautest: 3.6ml Trypanblau 0.5% (Serva), Dulbeccos PBS ohne Ca

und Mg 6.3ml, Zellsuspension 0.1ml

Zellen wurden mechanisch vom Boden entfernt,

5 min bei 1000g, Überstand verworfen, in PBS

5 min bei 1000rpm abzentrifugiert (PBS-Waschen, um das restliche Serum zu entfernen)

Pellet in PBS, Trypanblau

5 min RT, Neubauer-Zählkammer

(b) mitochondrialer Tetrazolium-Test, geeignet zur Bestimmung der Zellvitalität, Zellproliferation und Zytotoxizität:

Testprinzip:

Das Tetrazolium-Salz (Absorptionsmaximum bei 450nm) wird in lebenden Zellen verstoffwechselt zu Formazan-Salz durch eine mitochondriale Dehydrogenase (Absorptionsmaximum bei 650nm).

Dieses entsteht nur bei stoffwechselaktiven Zellen.

Die violetten Formazan-Salzkristalle werden solubilisiert und im ELISA-Reader quantifiziert. Die Absorptionswerte korrelieren direkt mit Zellzahl (und sind zwischen $A_{[450/650]} = 0.1$ und 0.7 linear, vgl. Boehringer, Zellproliferationskit I).

Zur Zytotoxizitäts- und Endpunktbestimmung nach Schadstoffbehandlung wurden Makrophagen in einer Beckton/Dickinson 96-Well-Kulturplatte mit 2×10^5 Zellen pro Vertiefung 1:1 in Schadstoff/Kulturmedium gehalten und mit $10\mu\text{l}$ /Vertiefung des resuspendierten EZ4U-Tetrazoliumsalses für 2 Stunden inkubiert, der Überstand verworfen, die Zellen in einem Lysepuffer lysiert und im ELISA-Reader bei 450 und 650nm die Absorption bestimmt.

MTT-Assay: EZ4U, Lyophilisat in 2,5 ml Lösepuffer, Fa. Boehringer, Mannheim (Lot ES 83)
96-well-Platte, 2×10^5 Zellen / well
Test zur Bestimmung von Zellvitalität, Zellproliferation und Zytotoxizität
alle Ansätze wurden in 6-fach Bestimmungen gemessen
Ansätze (Kontrolle und Schadstoff) $100\mu\text{l}$ /well, angegebene Zeit, $10\mu\text{l}$ / well EZ4U,
2h inkubiert. Nach 2h: Absorption bei 450nm und 650nm gemessen

3.3.3 Behandlung der Zellen

3.3.3.1 Humanmakrophagen

Die Makrophagen wurden auf nichtbeschichteten Glasplättchen (Durchmesser 44mm) in 4ml Kulturschalen für Calciumspektrofluorimetrieexperimente oder in 96er Kulturplatten ohne durch Zusatz von Differenzierungszytokinen und ~faktoren die Differenzierung zu forcieren und wurden in der zweiten Woche in Kultur für die Messungen verwendet.

Die Behandlung der Zellen erfolgt wie im jeweiligen Abschnitt der experimentellen Methodenbeschreibung erwähnt.

3.3.3.2 bovine chromaffine Zellen

Die Zellen wurden auf 2% Kollagen für die Calcium-Spektrofluorimetrie in 4ml Schalen mit Glasplättchen oder für die patch-Clamp-Versuche in 2ml Schalen gehalten.

Für die Calcium-Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen 45 Minuten mit 1 μ M Fura-2-Acetomethylester beladen, zweimal HBS-gewaschen und nochmals fünf Minuten in der Anlage gespült.

Als zellulärer Funktionsparameter diente 100 Sekunden Applikation von 50mM Kaliumchloridlösung, anschließend erfolgte die Belastung mit verschiedenen PCB 47-Konzentrationen in calciumhaltigen oder calciumfreien oder nifedipinhaltigen/nifedipinfreien Lösungen. Zellen, die auf die chemische Depolarisation nicht mit einer Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels reagierten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Fluoreszenzmessungen wurden nur in akuter PCB-Applikation durchgeführt.

Zur fünfstündigen PCB-Belastung der Zellen für patch-Clamp-Versuche wurden die Zellen wie die Makrophagen 1:1 v/v in Medium/HBS gehalten. Entsprechende Kontrollen wurden mitgeführt.

3.3.4 Methoden:

3.3.4.1 patch-Clamp-Methode

3.3.4.1.1 Ableitungen

Für die Elektroden wurde sowohl für die Masse als auch für die Referenzelektrode chlorierter Silberdraht verwendet. Chlorieren des Silberdrahtes erfolgte über Nacht in kommerziellem Badreiniger ('Chlorix', Fa. Henkel).

Die Gehäuse aller Geräte, alle Metallteile an der Meßstation, sowie der Faradaysche Käfig waren separat geerdet, um das Schwingen durch die intrinsische Kapazität der Geräte, sowie Störungen durch andere elektronische Geräte und das öffentliche Stromnetz zu vermeiden bzw. zu minimieren. Der unmittelbare Meßbereich (Mikroskop, Meßtisch, Headstage) waren zusätzlich durch einen Faradayschen Käfig abgeschirmt.

Die patch-clamp-Versuche wurden entweder im Ganzzell-('whole-cell')-Modus mit Kontrolle der ionischen Zusammensetzung des zellulären Milieus oder im Zellaufgesetzten('cell attached') Modus ohne Aufbrechen der Zellmembran durchgeführt. Messungen im cell-attached Modus bei Einzelkanalableitungen wurden deshalb gewählt, da Proteine des zellulären Signaltransduktionsapparates und regulatorische Komponenten der Ionenleitfähigkeiten nicht mit ausgewaschen werden, wie in der whole-cell-Konfiguration.

Bei Messungen über mehrere 10 Minuten bedeutet das auch ein Rundown des Membranpotentials durch Auswaschen energetischer Bestandteile wie ATP, GTP, cGMP und cAMP, außerdem von Proteinkomponenten der Signaltransduktion wie PKC, die im inaktiven Zustand zytosolisch gelöst, nach Aktivierung bestimmter Rezeptoren, die G-Protein-vermittelt über cAMP aktiviert aber in die Membran transloziert und integriert wird und über Phosphorylierungen die Funktionszustände von Proteinen wie Rezeptoren reguliert.

Da Daten aus perforated-patch-Messungen nicht gezeigt werden, soll auf diese Messmethode nicht weiter Bezug genommen werden.

Abgleich der kapazitiven Artefakte, des Elektrodenzugangswiderstandes (serieller Widerstand, R_s), das Kapazitive Artefakt der Zelle (C_{slow}), der Elektrode in der Badlösung (C_{fast}) und der seriellen Leitfähigkeit (G_s) erfolgte bei 0 mV nach Erreichen der whole-cell-Konfiguration bzw. in der cell attached-Konfiguration (bei Einzelkanalableitungen) und Messung des Membranruhepotentials durch Umschalten von Strom- auf Spannungsklemme. Aufgezeichnet wurden die Stöme in 10-facher Verstärkung.

Cell-attached-Messungen und die Einzelkanalableitungen wurden in 3000-facher Verstärkung durch Zwischenschaltung eines zusätzlichen Nachverstärkers (300-fach) mit low pass (1kHz)- und high pass-Filter (5kHz) aufgezeichnet.

Das Aufnahme Fenster wurde auf 300ms eingestellt, ein Reiz (Spannungssprung o.ä.) nach 5ms gegeben, der Filter am Verstärker auf 10kHz gesetzt. Die Reizfrequenz von 1 Hz wurde durch Parallelschaltung auf dem Oszilloskop kontrolliert, analog verstärkt durch den Vorverstärker EPC 7, durch den Analog-Digital-Wandler digitalisiert und in den Computer eingelesen (EPC 7-Software).

Die Auswertung der Spontanöffnungsfrequenzen von Einzelkanälen (Öffnungsdauer und Amplitude) erfolgte mittels durchsichtigem Milimeterpapier auf dem Computerbildschirm.

Die statistische Auswertung erfolgte im Graph pad-prism-programm (Graph pad software, San Diego, Ca, USA, Version 2.1).

Für das gesamte Spektrum vorhandener Ionenleitfähigkeiten wurden als Badlösung Na⁺-HBS und in der Elektrode Pipettenlösung A verwendet.

Bei der gezielten Betrachtung einzelner Ionenleitfähigkeiten wurden die K⁺-Ströme durch 3,4-Diaminopyridin und CsCl₂ von extra- und intrazellulär geblockt und zusätzlich von TEA-Cl intrazellulär. Natriumströme wurden durch Tetrodotoxin von extrazellulär und Ca²⁺-Stöme durch Ni²⁺ oder Cd²⁺ extrazellulär blockiert.

Für die Betrachtung einzelner Ionenleitfähigkeitsqualitäten wurden Bad- und Pipettenlösung entsprechend gewählt.

Für Calciumleitfähigkeitsmessungen wurde das intrazelluläre Milieu zusätzlich durch EGTA gepuffert (nicht bei Messungen von Calcium-aktivierten Kaliumkanälen, CRAC).

3.3.4.1.2 Patch-clamp-Konfigurationen:

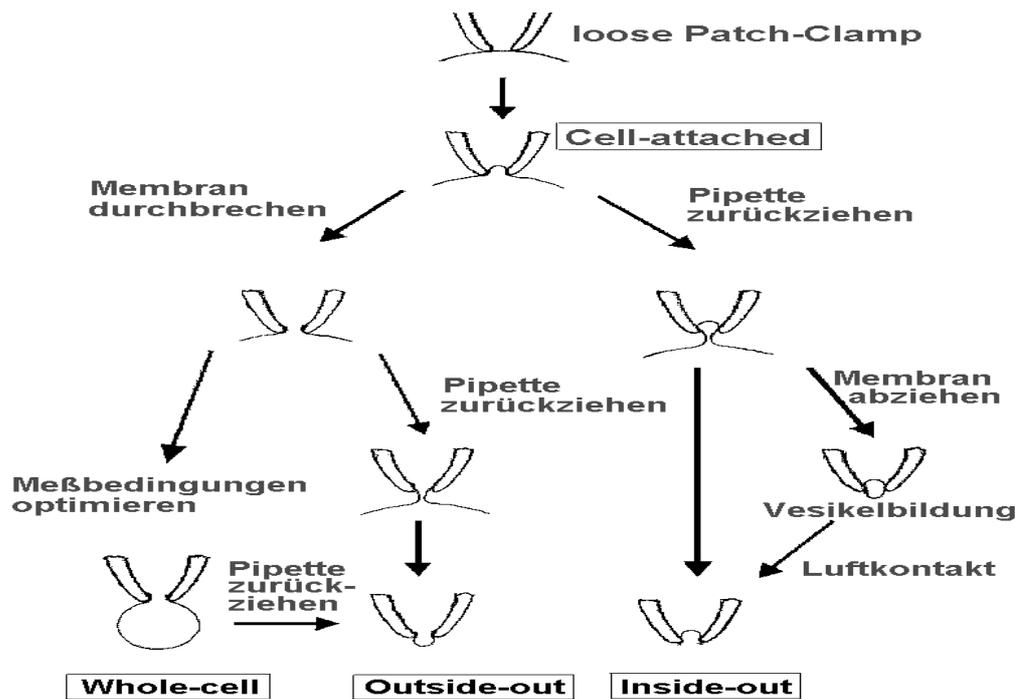


Abbildung 7: Patch-Clamp-Konfigurationen. Verwendete Konfigurationen (a) cell- attached und (b) whole-cell-Modus. Aus: Numberger & Draghun, 1996

patch clamp-Geräte:

Mit dem Elektrodenziehgerät (Fa. Mechanex SA Geneve) wurden für cell attached/whole-cell-Messungen 2-5MW-Elektroden ($T= 720 / 630 \text{ }^{\circ}\text{C}$), für Einzelkanalableitungen 5-10MW-Elektroden ($T= 750/650^{\circ}\text{C}$) in zwei Temperaturschritten gezogen.

Die Elektroden wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren für Gaschromatographie, GC 150F-10 mit 1.5 mm Aussendurchmesser X 0.86 mm Innendurchmesser, (Fa. Dunn Labortechnik GmbH, 53567 Asbach) angefertigt und anschließend Feuerpoliert (List-Medical L/M-CPZ 101).

Patch-Station bestand aus EPC-Software (MS-DOS-basierte Version, 1.0), einem Vorverstärker EPC 7 L/M, und einem Nachverstärker für Einzelkanalableitungen (Neurolog System, Digitimer Ltd., Nachverstärkung: V1: 100X, V2: AC/DC-Ampl., 30X, AC-Modus, Lowpass-Filter: 1kHz Highpass-Filter: 5kHz).

Für das Einlesen der Signale in den Rechner wurde ein AD/DA-Wandler (1401 plus) verwendet. Die Reizsignale wurden extern durch das EPC-Programm vom Rechner getriggert und alle Messungen parallel auf einem Oszilloskop (Fa. Hewlett-Packert 54504 A, 400 mHz, 200 MSa/s) kontrolliert.

Als Mikroskop wurde ein invertiertes Zeiss Axiovert 10, bei 320-facher Vergrößerung (Okular 10X, Objektiv 32X, Phasenkontrast, Phase I) verwendet.

Die Headstage (Fa. Physik Instrument PI, Typ: P-910-130) mit Elektrodenhalter wurde durch einen Grobtrieb (LN-PCT-2) und einen Feintrieb (Fa. Luigs & Neumann, Ratingen, Düsseldorf) eingestellt.

Der Elektrodenüber- und unterdruck wurde über eine 20ml-Spritze an einem Polyethylenschlauch mit Drei-Wege-Ventil durch bewegen eines Luftvolumens von etwa 0.5ml angelegt.

3.3.4.1.3 verwendete Lösungen:

Na⁺-Ströme:

Pipettenlösungen:

B: CsCl₂ 140mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 20mM, Na-ATP 2mM, GTP 0.05mM

4a: CsCl₂ 135mM, Hepes 10mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM, Na-ATP 4mM

Badlösungen:

B: TEA-Cl 135 mM, Hepes 10mM, MgCl₂ 1,2mM, BaCl₂ 10mM, ohne TTX
2mM CdCl₂

Ca²⁺-Stöme:

Pipettenlösungen:

B: CsCl₂ 140mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 20mM, Na-ATP 2mM, GTP 0.05mM

4a: CsCl₂ 135mM, Hepes 10mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM, Na-ATP 4mM

4c: CaCl₂ 10mM, Hepes 20mM, MgCl₂ 2mM, CsCl₂ 125 mM (für Purinoversuche, cell attached)

Badlösungen:

IV a: TEA-Cl 135 mM, Hepes 10mM, MgCl₂ 1,2mM, BaCl₂ 10mM, TTX 2mM

IV c: wie IV a, 10mM CaCl₂, statt BaCl₂

K⁺-Ströme:

Pipettenlösungen:

A: KCl 140mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 20mM, Na-ATP 2mM, GTP 0.05mM

Badlösungen:

Na⁺-HBS ± CdCl₂

IV b: ohne TTX

Zusätzlich wurden, wo angegeben, Ba²⁺-Stöme durch Calciumkanäle gemessen, da das Bariumion kleiner ist und alle Calciumkanäle eine höhere Leitfähigkeit für diese Ionenqualität aufweisen, was zu einer besseren Auflösung des detektierbaren Signals als Funktion des Kanalproteins führt (und verbessertem Signal-Rauschverhältnis), was bei geringer Dichte von Calciumleitfähigkeiten das Calcium Signal schlecht aufzulösen ist, ohne das Hintergrundrauschen mitzuverstärken.

Weitere Lösungen:

Elektrodenlösungen:

a: CsCl₂ 135mM, Hepes 10mM, EGTA 10mM, MgCl₂ 2mM, Na⁺-ATP 4mM

b: 2mM Na⁺-ATP, 2mM GTP

c: CaCl₂ 10mM, Hepes 20mM, MgCl₂ 2mM, CsCl₂ 125 mM (für Purinoversuche!)

pH 7.2 (mit Tetra-Ethyl-Ammoniumhydroxyd eingestellt, TEA-OH), Osmolarität: 300 mOsm

Badlösungen:

IV a: TEA-Cl 135 mM, Hepes 10mM, MgCl₂ 1,2mM BaCl₂ 10mM, TTX [2μM]

IV b: wie IVa, ohne TTX

IV c: wie IVa, 10mM CaCl₂, kein BaCl₂

IV d: wie IVa ohne TTX, 10mM CaCl₂, kein BaCl₂

pH 7.2 (mit Tetra-Ethyl-Ammoniumhydroxyd eingestellt, TEA-OH), Osmolarität: 255mOsm

Zur fünfstündigen PCB-Belastung für patch-Clamp-Versuche wurden chromaffine Zellen wie Makrophagen 1:1 v/v in Medium/HBS gehalten. Entsprechende Kontrollen wurden mitgeführt.

3.3.4.2 Calcium-Spektrofluorimetrie

verwendete Lösungen:

Na⁺-HBS: NaCl 150mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.8mM, MgSO₄ 0.8mM, Glucose 20mM, Hepes 20mM, pH 7.3 (mit Trisma-Base)

Na⁺- HBS ohne Calcium: s. HBS, statt CaCl₂: EGTA 1.0mM, pH 7.3 (mit Trisma-Base)

für die Kalibrierung der Anlage:

R_{min}-Lösung: NaCl 130mM, KCl 5.4mM, MgSO₄ 0.8mM, Glucose 20mM, Hepes Na⁺ 20mM, EGTA 10mM

pH 7.3 (Trisma-Base), Ionomycin 10μM, Gramicidin 35μg/ml, 10μM Tetrakis-Piperazin

R_{max}-Lösung: NaCl 150mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 8mM, MgSO₄*7H₂O 0.8mM, Glucose 20mM, Hepes 20mM

pH 7.3 (Trisma-Base), Ionomycin 10μM, Gramicidin 35μg/ml, TPEN 10μM

Die Echtzeitmessungen des intrazellulären Calciumspiegels wurden mit PTI-Image-Master 1.x-Software (Photon technology international, New Jersey, USA) mit einem Deltascan 4000-Laser und einem OC 4000 Chopper, Xenon-Lichtquelle (Phasen-Verschiebung: 90°) und einer intensivierten Fluoreszenzkamera (SIM-ICCD 04, Fa. SIM) durchgeführt.

Die Samplerate wurde auf 1/3 Hz eingestellt mit einem Wellenlängenwechsel pro 250ms. Die Monochromatorpositionen wurden auf 237 und 241nm gesetzt, sodass die Lichtbeugung am Spalt monochromatisches Licht der Wellenlängen 340 und 380nm erzeugt.

Die Samplefrequenz wurde auf 5 Bilder pro Minute eingestellt.

Die Fluoreszenzanlage war über zwei Bündel von Quarzfasern für das Anregungslicht mit dem Lichtmikroskop (Zeiss, Axiovert TV 100) verbunden. Über ein Ölimmersionsobjektiv (40x) wurde die Fluoreszenz von acht bis dreizehn Zellen simultan über die Fluoreszenzkamera in den Computer eingelesen.

Prinzip der Echtzeit-Calcium-Spektrofluorimetrie:

Fura-2 wird in Form von Fura-2-Acetomethylester in die Zellen aktiv aufgenommen. Im Cytosol wird der Acetatrest durch Esterasen abgespalten, damit verbleibt Fura-2 im Cytosol und gelangt nicht in die Kompartimente und nicht wieder aus der Zelle heraus. Somit sind Calciumverschiebungen über drei Kompartimente zu studieren: zwischen Extrazellulärraum und Cytosol, zwischen Cytosol und intrazellulären Kompartimenten und von intrazellulären Calciumsequestrierräumen ins Cytosol, wobei Verschiebungen über Pumpen oder Calcium-leitende Ionenkanäle stattfinden.

Gemessen wird der Calciumgehalt im Cytosol als Funktion der Fura-Absorption, die mit steigender Calciumbindung bei 340 nm zunimmt. Bei 361nm befindet sich ein isosbestischer Punkt. Bei

dieser Wellenlänge ist die Furaabsorption Calcium-unabhängig.

Fura-2 ist ein synthetisch hergestellter Calcium-Indikator (Puni und Tsien, R. 1982), mit zwei Absorptionsmaxima bei 340 und 380nm und einer Emissionswellenlänge von 510nm. Bei 340nm ist die Absorption calciumabhängig, je mehr Calcium in der Zelle vorliegt und gebunden wird, desto stärker die Absorption. Bei 380nm wird der Anteil des freien, also nicht Calcium-gebundenen Farbstoffes bestimmt.

Fura besitzt vier Bindestellen für Calciumionen, die nach dem Massenwirkungsgesetz mit einer Dissoziationskonstante $K_D = 222 \text{ nM}$ die freie Calciumkonzentration liefert. Das Fura-gebundene Calcium kann durch Manganionen verdrängt werden.

Experimentell wird der Quotient der Absorption/Emission bei 340: 510 pro 380:510nm als Ratio bestimmt, die somit direkt Calcium-abhängig ist und unabhängig von der Emission und einen dimensionslosen Quotienten als Ratio liefert.

Die von der Kamera detektierte Epifluoreszenz wird über einen Mikrochip der Kamera mit 256 x 256 Feldern parallel und unendlichem Focus verstärkt und über einen Analog-Digitalwandler digitalisiert in den Rechner eingelesen.

Für die Bildaquirierung wurden vier Bilder rechnerisch gemittelt, was die Bildschärfe verringert aber die Intensität erhöht.

Die pixel by pixel dimensionlosen Bilder wurden mit einer Ratio von 0.04 bis 20 aquiriert.

Die Echtzeit-Calciummessungen der Hintergrund-substrahierten Bilder erfolgten mit einem Kamera-blacklevel ≈ 1 .

Die Kalibrierung der Anlage mit den R_{\max} und R_{\min} Lösungen wird für eine Umsetzung der Fluoreszenzintensität in absolute Calciumwerte benötigt.

Für die Berechnungen der basalen Ratio bzw. Calciumwerte zu Beginn der Messungen wurden vor Agonistenapplikation die Werte 1-25 als Basallinie, was den ersten fünf Minuten entspricht, gemittelt.

Der intrazelluläre Calciumgehalt $[Ca^{2+}]_i$ kann nach der folgenden Gleichung aus der Ratio der beiden Fluoreszenzquotienten abgeleitet werden, die Fluoreszenz- Ratio [R] des gebundenen Calciums und freien Calciums korreliert nach:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

Gleichung 1: Meßparameter bei der In situ –Kalibrierung der Zellen für die Bestimmung des molaren Calciumspiegels

R_{\min} und R_{\max} , sowie die Konstante S_{f2}/S_{b2} werden experimentell abgeleitet über eine In-situ-Kalibrie-

rung der Ratio mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin (beschrieben von A.P.Thomas und Fernando Delaville, 1991). Die Kalibrierung wird durchgeführt bei 340 und 380nm mit einem extrazellulären calciumfreiem Ringer, der Ionomycin, Gramicidin und das Piperazinderivat T-Pen als Ionophoren enthält.

Zunächst entzieht man den Zellen extrazellulär das Calcium unter Anwesenheit von EGTA und den Ionophoren. Das in der Zelle enthaltene ungebundene Calcium wird so weitgehend aus der Zelle entfernt, das an den Farbstoff gebundene bleibt im Cytosol zurück und so die minimal an Fura gebundene Menge Calcium ermittelt.

R_{min}/R_{max} Berechnung und Kalibrierung

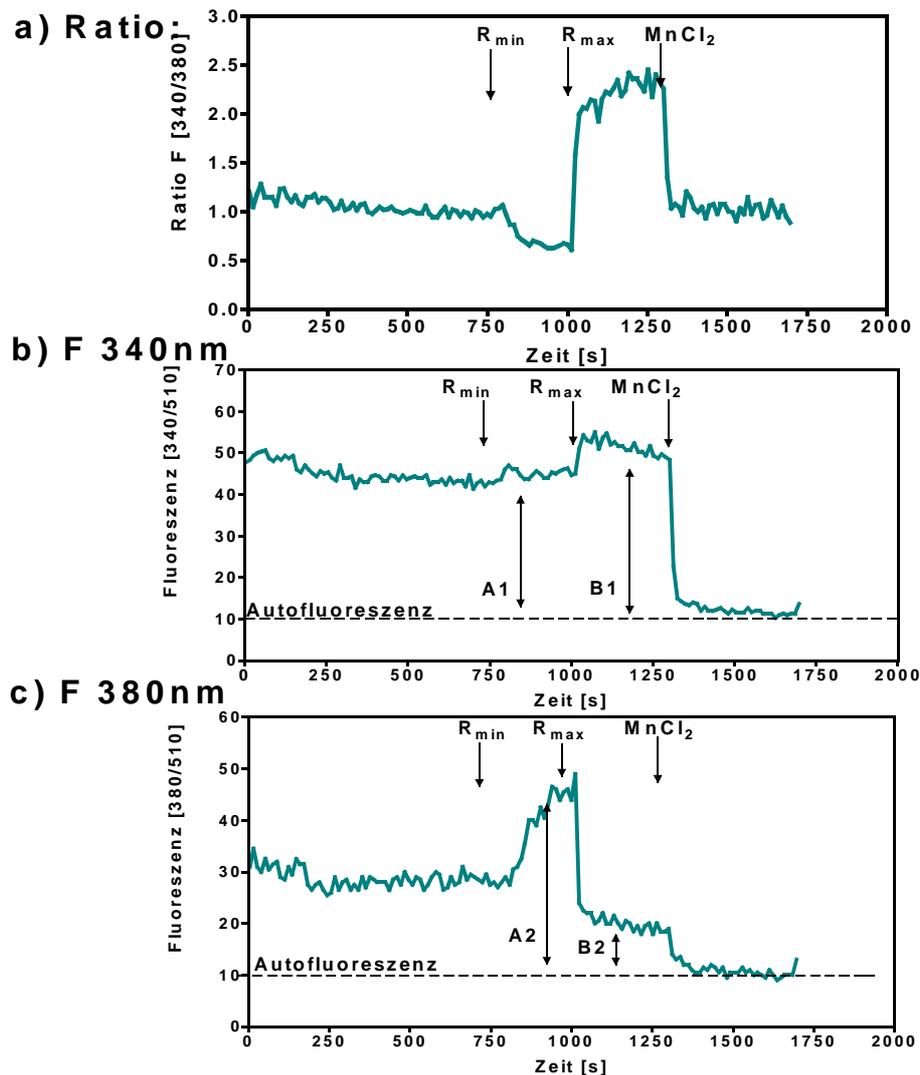


Abbildung 8: Parameter zur Ermittlung der Ratio-Kalibrierung am Beispiel einer Zelle aus einem Ansatz bei Humanmakrophagen. (a) Ratio, (b) Fluoreszenzänderungen bei 340nm: 510nm [F 340:510] und (c) Fluoreszenzänderungen bei 380nm:510nm [F380:510]. Die Ratio [340/510:380/510 = 340/380] ist danach dimensionslos und erhält seine Dimension allein durch die Bindungskonstante K_D in Gleichung 1.

Anschließend wird mit calciumhaltigem Ringer das in den Zellen enthaltene Fura vollständig Calcium beladen und so die maximal gebundene Menge Calcium ermittelt.

Die Konstante $S_{1/2}/S_{b2}$ nach der Gleichung ergibt sich durch A_2/B_2 . Nach Subtraktion der Autofluoreszenz ist R_{max} gegeben durch B_1/B_2 und R_{min} durch A_1/A_2 .

Bei Zellen mit hohem Vesikelgehalt im allgemeinen aber bei Makrophagen im Besonderen treten ein die Messgenauigkeit verzerrendes Problem auf: die die Messwerte verfälschende Autofluoreszenz der Zellen, die durch bei der Kalibrierung zugesetztes $MnCl_2$ [10mM] ermittelt wird, das das restliche gebundene Calcium vom Fura vollständig verdrängt. Die dann noch messbare Fluoreszenz ist die Gewebs-Eigenfluoreszenz der Makrophagen:

Die Autofluoreszenz ist der Anteil, der nach Löschen der Fura-Fluoreszenz mit $MnCl_2$ [10mM] noch übrigbleibt. Für die Berechnung der einzelnen Parameter wird dieser Wert von der Gesamtfluoreszenz abgerechnet. Bei Makrophagen liegen die durch Fura bestimmbaren Calciumwerte zwischen 50nM bis 2 μ M, in natürlichen Systemen meist zwischen 10^{-8} M und etwa 10^{-6} M Calcium intrazellulär [Nach Grzynekiewicz et al., 1982].

Alle Calciummesswerte in der vorliegenden Arbeit sind als Ratio-Werte angegeben, was durchaus internationalen Gepflogenheiten entspricht (Ashner, M., Wiegand, H., persönliche Kommunikation).

Die Beladung der Zellen erfolgte mit 1 μ M Fura-2-Acetomethylester für 30min bei Makrophagen und 45 Minuten bei bovinen chromaffinen Zellen.

Die Furabeladung der Zellen erfolgte 30 Minuten vor Versuchsbeginn. Nicht in die Zellen aufgenommenes und nicht hydrolysiertes Acetomethylester (Fura-2-AM) wurde durch zweimaliges Spülen in der Kulturschale und fünf Minuten in der Anlage mit Na^+ -HBS entfernt.

In allen im Ergebnisteil dargestellten Konzentrations-Effektbeziehungen ist die Änderung des zytosolischen Calciumgehaltes in den Zellen als Ratio angegeben.

Für die pharmakologische Bewertung aller Konzentrations-Effektbeziehungen in Scatchardanalysen und nichtlinearer Regression mit hyperbolischem Anpassungsmodell und nicht linearer Regression mit sigmoider Anpassung wurden die Ratiowerte aller Konzentrations-Effektbeziehungen zuerst in Nanomole Calcium, wie in der in situ Calcibrierung beschrieben, umgerechnet.

Nachfolgend wurden die B_{max} , K_A bzw. K_D - und EC_{50} -Werte entsprechend der nichtlinearen Anpassungsmodelle errechnet und in der Übersicht in Tabelle 5 dargestellt.

Behandlung der Zellen

(a) Makrophagen:

Die Konzentrations-Effekt-Beziehungen für ATP wurden in aufsteigenden Konzentrationen von 0.1µM bis 100µM mit einem Zeitintervall von 40 Minuten zwischen den einzelnen Stimuli über bis zu drei Stunden als Kontrolle und nach 5h Vorbehandlung mit PCB 47 oder 1.5h N-Acetyl-D-Arginin (NAA, 10µM) erstellt.

Für die NOS-Inhibitor-Abhängigkeit der ATP-induzierten Calciumspiegelerhöhung wurden die Zellen 1.5h mit dem Inhibitor vorbehandelt und nachfolgend die ATP-Antwort bei 100µM ATP aufgezeichnet. Für die PCB-Konzentrationsabhängigkeit der ATP-induzierten Calciumspiegel-erhöhung wurde die ATP-Antwort nach PCB-Vorbehandlung bei der etwa halbmaximalen ATP-Konzentration von fünf Mikromolar ATP aufgezeichnet.

Die Agonisten-Screening-Experimente wurden mit und ohne PCB 47-Vorbehandlung durch 100 Sekunden-Applikation und Auswaschen der betreffenden Agonisten in achtminütigem Abstand durchgeführt.

Die Konzentrations-Effektbeziehungen für ATP bei extrazellulärer Calciumfreiheit mit und ohne PCB 47-Vorbehandlung wurden erstellt, indem die Zellen nach Vorinkubation und 30 minütiger Fura-Beladung in der Anlage nach 5 Minuten für fünf Minuten in Calcium-freiem Na⁺-HBS-Ringer überspült wurden und 100 Sekunden mit ATP in calciumfreiem HBS stimuliert wurden. Da in diesen Ansätzen keine wiederholte ATP-Applikation erfolgen kann, wurde für eine ATP-Konzentration jeweils mindestens ein eigener Ansatz mit $N \geq 9$ Zellen verwendet.

Die Zellen wurden nie länger als 6 Minuten in calciumfreier Lösung gehalten.

Die Zellen wurden wie angegeben kultiviert. Zur akuten Belastung wurden die Zellen nicht vorbehandelt.

Für die Calcium-Spektrofluorimetrie wurden die Zellen 30 Minuten mit 1µM Fura-2-Acetylmethylester (Fura-2-AM) in Na⁺- HBS im Brutschrank inkubiert, danach zweimal HBS-gespült und in der Anlage nochmals 5 Minuten mit Na⁺- HBS superfundiert, um restliches nicht verstoffwechseltes Fura-2AM zu entfernen.

Zur Schadstoffbelastung über 1.5 bzw. 5 Stunden der Zellen wurde das Kulturmedium gegen 1:1 v/v Medium/HBS entweder mit 0.1% DMSO, dem unspezifischen ATP-Antagonisten Suramin, den PCBs oder NOS-Inhibitor ausgetauscht.

Zur Erstellung der Adenosintriphosphat-Konzentrations-Effektbeziehungen in der Calcium-Spektrofluorimetrie wurde zunächst die Zell-Desensitivierung durch kumulative ATP-Applikation getestet.

Alle Konzentrations-Effektbeziehungen in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration wurden durch randomisierte Applikation verschiedener ATP-Konzentrationen für 100 Sekunden und Auswaschen in der Fluorimetrieanlage mit 40 minütigem Abstand und einem Durchfluss von 1.6ml/Minute erstellt. Bei 40 minütigem Abstand zwischen zwei äquimolaren ATP-Applikationen erreicht die zytosolische Calciumspiegelerhöhung im paired-t-Test das Niveau der Ersten und ist damit nicht signifikant verschieden.

Zur Vergleichbarkeit der 5 Stunden PCB 47- bzw. 1.5 Stunden N^G-Amino-L-Arginin (NAA)-Inkubation wurden die Zellen für den NOS-Inhibitor (NAA) 3.5h in HBS inkubiert, NAA zugesetzt und bis 5h geführt.

Für die Testung des spezifischen ATP-Antagonisten XAMR und des NO-Donors SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-Penicillamin) wurden die Zellen mit Fura-2 beladen, in der Anlage mit ATP-stimuliert (im Folgenden als ATP-Erstantwort bezeichnet), 25 Minuten HBS und 15 Minuten mit dem Inhibitor oder dem NO-Donator superfundiert und nachfolgend ein zweites Mal mit ATP stimuliert (im Folgenden als ATP-Zweit- oder Sekundärantwort bezeichnet) und aufgezeichnet. Ausgewertet wurde die Veränderung der Zweit- gegenüber der Erstantwort.

Angegeben wurden entweder die absoluten Ratio-Werte (alle kompletten Konzentrations-Effekt-Beziehungen) der ATP-induzierten maximalen intrazellulären Calciumerhöhungen oder im Fall der Antagonisten XAMR oder Suramin die delta-Ratio (maximale ATP-induzierte Calciumerhöhung abzüglich der Basallinie, die durch Mittelung der unstimulierten Ratio-Werte 1-25 errechnet wurde).

Bei der Calciumspektrofluorimetrie zum Studium des Phospholipase C und D-Inhibitors wurden die Zellen in den Kontrollansätzen nicht vorbehandelt, in den PCB-Ansätzen über fünf Stunden mit dem PCB 47 inkubiert, mit Fura beladen und anschliessend in die Anlage verbracht.

Nachfolgend wurden die Zellen für jeweils fünf Minuten mit 1µM des PLC/PLD-Inhibitors U 73122 superfundiert und die intrazelluläre Calciumerhöhung nach 50µM 2,3-(4-O-benzyol-benzoyl)-ATP aufgezeichnet.

In der Darstellung der zytosolischen Calciumerhöhung wurde statt der Maximalwerte der durch das benzyol-benzyol-ATP ausgelösten Calciumerhöhung die Fläche unter der Kurve (AUC...area under the curve) angegeben, indem die basalen unstimulierten zytosolischen Calciumwerte 1 bis 25 als Basallinie errechnet wurden und die benzyol-benzyol-ATP induzierte Abweichung davon bis zum erneuten Erreichen der Basallinie angegeben wurde. Diese AUC-Werte (area under the curve) haben deshalb die Dimension Ratio x Sekunde und entsprechen somit einem Integral der benzyol-benzyol-ATP ausgelösten reversiblen zytosolischen Calciumerhöhung.

Dieses Verfahren wurde deshalb gewählt, da erstens die Beeinflussung eines rezeptorassoziierten

Proteinsystems verfolgt wurde, und vorallem zweitens, da die Zellen nach PCB 47 im Vergleich zur Kontrolle einen langandauernden zytosolisch erhöhten Calciumspiegel zeigen, nach Phospholipaseinhibitor alleine oder zusammen mit PCB 47 aber praktisch überhaupt nicht reagieren. Die Konzentrations-Effektbeziehungen für ATP mit und ohne PCB 47-Vorbehandlung wurden erstellt, indem die Zellen nach Vorinkubation und 30 minütiger Fura-Beladung in der Anlage nach 5 Minuten für fünf Minuten in Calcium-freiem Na⁺-HBS-Ringer überspült wurden und 100 Sekunden mit ATP in calciumfreiem HBS stimuliert wurden. Da in diesen Ansätzen keine wiederholte ATP-Applikation erfolgen kann, wurde für eine ATP-Konzentration jeweils mindestens ein eigener Ansatz mit N \geq 9 Zellen verwendet.

Die Zellen wurden nie länger als 6 Minuten in calciumfreier Lösung gehalten.

Für die NOS-Inhibitor-Abhängigkeit der ATP-induzierten Calciumspiegelerhöhung wurden die Zellen 1.5h mit dem Inhibitor vorbehandelt und nachfolgend die ATP-Antwort bei 100 μ M ATP aufgezeichnet. Für die PCB-Konzentrationsabhängigkeit der ATP-induzierten Calciumspiegel-erhöhung wurde die ATP-Antwort nach PCB-Vorbehandlung bei der etwa halbmaximalen ATP-Konzentration von fünf Mikromolar ATP aufgezeichnet.

Die Agonisten-Screening-Experimente wurden mit und ohne PCB 47-Vorbehandlung durch 100 Sekunden-Applikation und Auswaschen der betreffenden Agonisten in achtminütigem Abstand durchgeführt.

Nach Vorbehandlung wurden die Zellen ebenfalls zweimal HBS gespült und nochmals fünf Minuten in der Anlage.

(b) chromaffine Zellen:

Für die Calcium-Fluoreszenzmessungen wurden die Zellen 45 Minuten mit 1 μ M Fura-2-Acetomethylester beladen, zweimal HBS-gewaschen und nochmals fünf Minuten in der Anlage gespült.

Als zellulärer Funktionsparameter diente 100 Sekunden Applikation von 50mM Kalium-chloridlösung, anschließend erfolgte die Belastung mit verschiedenen PCB 47-Konzentrationen in calciumhaltigen oder calciumfreien oder nifedipinhaltigen/nifedipinfreien Lösungen. Zellen, die auf die chemische Depolarisation nicht mit einer Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels reagierten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Fluoreszenzmessungen wurden nur mit akuter PCB-Applikation durchgeführt.

3.3.4.3 Immunhistochemischer Nachweis der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase:

Lösungen:

PBS-Puffer: Dulbeccos PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}
Aceton (-20°C kalt)
Vectastain-ABC-Kit, Ziege anti Kaninchen (goat a-rabbit)
Diaminobenzidin
Aqua bidest.
Ethanol (rein, 96%, 80%)
Xylol
DePeX-Einbettmedium
Primärantikörper
PBSA: 3% BSA in PBS

Der immunhistochemische Nachweis beruht auf einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der den Fc-Teil (IgG) des primären anti-humane -induzierbare- NOS-Antikörper (Ziege à Kaninchen) erkennt.

Testprinzip:

Diaminobenzidin wird in Gegenwart von H_2O_2 von der Meerrettichperoxidase (HRP = Horsereddishperoxidase) zu einem System konjugierter Doppelbindungen umgesetzt. Die Reaktion wurde nach 12 Minuten durch zweimaliges Spülen für jeweils 5min mit Aqua bidest gestoppt.

Je mehr iNOS in den Zellen vorhanden ist, desto dunkler verfärbt sich die Probe.

Das System ist intern nicht eichbar, deshalb wurde in der Auswertung die Farbintensität relativ zur Kontrolle ausgewertet.

Durchführung der Immunhistochemie:

Primärantikörper: polyclonaler Kaninchen anti Mausmakrophagen iNOS-Antikörper aus Antiserum (210/504-R100, Fa. Alexis Biochemicals, D-35305 Grünberg), eingesetzt 1: 1000 im Ansatz.

Spezifität: Aminosäurereste 1131-1144 mit einem zusätzlichen Cysteinrest N-terminal. Ausgetestet 1: 500 und 1:1000, erkennt humane-, murine- und Ratten- iNOS, nicht n- oder e-NOS.

Für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung der behandelten fixierten Zellen wurden die Umrandungen der Objektträger entfernt und die Objektträger in einem Tauchschlitten 3 x 5 min in PBS bei Raumtemperatur (RT) gewaschen.

Die Färbereaktionen (Sekundärer Ziege à Kaninchen-Antikörper, biotinyliert, Avidin-Biotin-HRP-Komplex, Ziegenserum) wurden mit dem Vectastain-ABC-Kit durchgeführt (Vector-Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 USA).

Das Versuchsprotokoll wurde nach eigenen Bedürfnissen wie folgt modifiziert:

Nach Ablauf der Inkubationszeit und Aceton-Fixierung wurden die Objektträger für 20 min mit H₂O₂ (Endkonzentration 0.3%) gespült, um endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren, anschließend wiederum 3x5 min in PBS.

Um Hintergrunderhöhung durch unspezifische Bindung zu verringern, wurden die Objektträger nachfolgend für 1 h mit Serum der Spezies des Sekundärantikörpers (Ziege) präinkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei 4°C für 16h mit dem primären Kaninchen à Maus- Makrophagen-iNOS (1:1000, in 3% PBSA) inkubiert.

Nachfolgend wurden die Objektträger 3 x 10min in PBS gewaschen und 45 min mit dem sekundären Ziege à Maus-IgG-Antikörper (biotinyliert) inkubiert, wiederum 3 x 10 min in PBS gewaschen, und 45 min mit dem Avidin-Biotin-HRP-Komplex inkubiert.

Nach dreimaligem PBS-Waschen (à 30 min) erfolgte die Färbereaktion mit Diaminobenzidin/H₂O₂ (1Tablette à 15ml PBS/ 12µl H₂O₂) für 13 Minuten (nicht gelöstes DAB wurde durch 200µm-Rotrandfilter entfernt).

Die Reaktion wurde gestoppt durch 2 x 5 min Aqua bidest und die Zellen nachfolgend für die Einbettung in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert:

jeweils 2 x 2min 80, 96 und 100% Ethanol, 2 x 3 min Xylol und für die Einbettung mit etwa 200µl DePEX Einbettmedium (Fa. Serva) und Deckglas versehen, 3 Stunden im Luftstrom des Abzugs getrocknet und anschließend lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Auswertung erfolgt mittels einem Olympus BX 60 Fluoreszenzmikroskop (40X UPlan /0.75PH2 ∞/0.17) an das eine Sony DXC 950PBCCD Farb Video Kamera angehängt war, über die die Zellen des Objektträgers in ein Bildverarbeitungsprogramm eingelesen wurden.

Bild-Aquisition:

Die Bildaquirierung erfolgte über direktes Einlesen in das Software-Bildverarbeitungsprogramm des Rechners nach kamerainternem Helligkeitsabgleich durch AWB-Hintergrundkorrektur, der zur Verbesserung des Hintergrund/Bildverhältnisses führt. Die Bildschärfe wurde über Filter 1 des Standbildes optimiert.

Software: analySIS 3.0, '98, soft imaging system corp 1675 Carr St.-Suite 105 N, Lakewood, CO 80215, USA

Die Zellen wurden als ROIs (Regions of interest) festgelegt mit Detektionslimit vertikal und horizontal > 10µm. Als interne Programmeinstellungen wurden die Farbschwellenwerte wie folgt gesetzt: rot: 120/185, grün: 38/190, blau: 0/130

Die Farbintensitäten der Zellen wurden durch Autodetektion nach Setzen der Farbschwellenwerte

als pixel / ROI bestimmt, d.h. nicht gefärbte oder wenig gefärbte Zellen auf Hintergrundniveau wurden nicht detektiert.

Alle Ansätze wurden mit denselben Helligkeitseinstellungen und derselben Hintergrundkorrektur aquiriert und die Farbtintensitäten als relativ-Werte gegenüber der Kontrolle für N = 85 Zellen in jedem Ansatz in Excel 5.0 und im graph-pad-prism-Programm 3.0 ausgewertet.

Behandlung der Zellen

Die Zellen wurden in Beckton-Dickinson 2-Kammer-Objekträger in Kompletmedium mit 1×10^6 Zellen/ml, 1ml pro Kammer kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium durch Versuchspuffer ersetzt.

Die Zellen wurden 1/1 V/V in HBS/Medium als Kontrolle ohne Zusatz, DMSO-Kontrolle (0.1%), 30 Minuten LPS [10µg/ml], 5h 100µM PCB 47, 100 Sekunden 10µM ATP oder benzoyl-benzoyl-ATP und 30 Minuten LPS bzw. 5h PCB 47 mit nachfolgend 100 Sekunden bzw. benzoyl-benzoyl-ATP inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kammern 2 x in Na⁺-HBS gespült, mit Kulturmedium versetzt und bis zum Zeitpunkt t = 16 h über Nacht im Brutschrank gehalten.

Nach 16h wurde 2 x mit Na⁺-HBS gewaschen und die Zellen 15 Minuten in 1 ml -20°C eiskaltem Aceton fixiert.

Für die Immunhistochemie wurden die Zellen für die angegebenen Zeiträume bis zu 5 Stunden 1:1 V/V in Medium/ HBS behandelt, anschließend zweimal HBS gewaschen und in reinem Zellkulturmedium 16h gehalten. Nach 16 Stunden und zweimaligem Waschen in HBS wurden die Zellen für 15 Minuten in -20°C kaltem Aceton fixiert.

3.3.4.4 Bestimmung des Einflusses von PCB 47 auf die Freisetzung eines typischen

Makrophagenzytokins, TNF- α , mittels TNF- α -Cytokin-Assays :

humaner TNF- α -Standard: 1- 5 pg

Die hu-TNF-Freisetzungsexperimente wurden mit hu- α TNF- α -Antikörpern, freundlicherweise von der Universität Maastricht und der Abteilung Toxikologie von Fasern und Stäuben am medizinischen Institut für Umwelthygiene zur Verfügung gestellt, durchgeführt.

Die TNF- α -Freisetzung von Humanmakrophagen wurde in 96-well-Mikrotiterplatten gemessen.

Die Zellen wurden dazu in 4 ml-Zellkulturschalen vorinkubiert.

Die Ansätze wurden alle 1:1 in Na⁺-HBS/ Zellkulturmedium gehalten, d.h. der Serumanteil in den Ansätzen lag bei 4%.

Nach 1h, 5h, 10h, 16h und 24h wurden 500µl Überstand entnommen und bei -80°C gelagert.

Für jeden Zeitpunkt wurde ein unabhängiger Ansatz inkubiert (Dreifachbestimmungen).

Ansätze bei 12 Tage alten Makrophagen:

als Positivkontrolle 30 Minuten [10µg/ml] Lipopolysaccharid, 5h PCB 47 [100µM], 100 Sekunden 2', 3' [4-O-benzoyl-benzoyl]-ATP [AMP-PCP] [10µM], 100 Sekunden Adenosintriphosphat [100µM] und eine unbehandelte Kontrolle.

Außerdem wurden in kombinierten Ansätzen die Zellen mit 30 Minuten LPS und 100' benzoyl-ATP und 5h PCB und 100' bz-ATP behandelt.

TNF-ELISA:

ELISA-Reader: Labsystem Multiscan Ascent

Software: Labsystem, OY, Helsinki, Finland

Der primäre coating AK (61E71, s.a. Schins/Borm, Occup. and environm. medicine 1995, , 52:pp 441- 450), wurde freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von der Abteilung für Innere Medizin, medizinische Fakultät an der Universität Maastricht, Prof. Dr. Debets und Prof. Dr. Paul Borm am medizinischen Institut für Umwelthygiene, Abteilung für Toxikologie von Fasern und Stäuben. Verdünnung 1:1000 in PBS.

rekombinantes humanes TNF-α: dto, Verdünnung 1:500 in 0.1% PBSA

primärer Sandwich-Antikörper: Kaninchen à huTNF, IgG-Fraktion, 1:1000 in 0.1% PBSA.

Zweitantikörper: Ziege à Kaninchen-IgG, Peroxidase-gekoppelt, 1: 8000 in 0.1% PBSA.

Tetramethyl-Benzidin (TMB): Fa. Biorad

H₂SO₄: Sigma

Tween 20: dto.

PBSA: PBS (Fa. Dulbecco ohne Ca/Mg) mit 1 % bovinem Serumalbumin (Sigma)

Durchführung:

Die Vertiefungen der 96-well-Mikrotiterplatte wurden für 16 h über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (61E71, 1:1000 in PBS) beschichtet und nach Ausklopfen mit dem rekombinanten humanen TNF-α (1:500, 5 ng/ml, und in entsprechenden Verdünnungen in Doppelbestimmungen in 0.1% PBSA) für den Standard 4h inkubiert.

4 x 2 Vertiefungen wurden für Hintergrundmessungen nur mit Puffer inkubiert. Nach Ausklopfen der Platte wurden alle Vertiefungen für eine Stunde mit dem primären Detektionsantikörper, Kaninchen à humanes TNFα (1:1000), für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Ausklopfen der Platte wurden die Vertiefungen mit dem sekundären Detektionsantikörper, Ziege anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt (1:8000) bei Raumtemperatur

für 1 Stunde inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 0.1% Tween 20-Lösung in Millipore wurden die Vertiefungen mit Tetramethyl-Benzidin 13 Minuten inkubiert und die Reaktion mit 100µl 1 M H₂SO₄ gestoppt.

Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen und aus der Standardkurve die jeweilige TNF-α- Freisetzung errechnet.

3.3.4.5 Bestimmung der TNF-α-Boten-RNA nach PCB 47 durch Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR):

Nach den TNF-α-Freisetzungsexperimenten (s. Abschnitt 3.7, TNF-Freisetzungsexperimente) wurde die Induktion der TNF-α-messenger-RNA in dergleichen Ansätzen verfolgt. Diese Ansätze sollten klären, ob verringerte TNF-α- Level nach PCB 47-Vorbehandlung auf normale Transskription aber veränderte Translation/Freisetzung zurückzuführen sind.

Die RT-PCR wurde in drei Schritten durchgeführt:

zunächst wurde die Gesamt-Boten-RNA (m-RNA) aus 2 x 10⁶ Makrophagen isoliert, als nächstes amplifiziert und in cDNA umgeschrieben und das TNF-α-cDNA-Gen (nur bestehend aus den Exons) mit *Thermophilus aquaticus*-Polymerase amplifiziert. Als Amplifikationskontrolle diente dabei das Haushaltsgen Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, das in allen Zellen standardmäßig exprimiert wird.

(a) Isolierung der Gesamt-messenger-RNA aus Makrophagen mittels Tri-Reagent:

Ausschließlich sterile, für RNA-Techniken vorbereitete Artikel wurden eingesetzt (wegen der ständigen Kontaminationsgefahr durch Fremd-DNA/RNA, die die Ergebnisse verfälschen würde, weil ebenfalls amplifiziert).

Auftrennungsprinzip:

Die Zellen werden nach Entfernung des Kulturmediums für 10 Minuten mit 2 ml Trireagent inkubiert, was zur Lyse der Zellmembran, dem Ablösen der Zellen und Freisetzung der Zellkomponenten führt. Das Reagenz besteht aus einer Mischung aus Guanidinium-Thiocyanat und Phenol.

Nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation trennt sich die Mischung in drei Phasen: die obere, wässrige Phase enthält die Gesamt-RNA, die mittlere, Interphase, die DNA und die untere, organische Phase die Proteine.

Die Auftrennung erfolgt also nach der Polarität. Der erste Schritt der Inkubation mit Tri-Reagent lysiert einerseits die Membran und nachfolgend vorallem wird der Nukleoprotein-DNA-Komplex dissoziiert.

2 x 10⁶ Zellen der verschiedenen Ansätze wurden zweimal mit Na⁺-HBS gewaschen, der Überstand entfernt und mit jeweils 2 ml Tri-Reagent versetzt und für 10 Minuten im Abzug bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch mehrmaliges Spülen vom Boden gelöst wurde das Lysat in 2ml-Eppendorf-Gefäße überführt und mit 0.2 ml Chloroform pro Ansatz versetzt und für 9 Minuten bei Raumtemperatur ausgeschüttelt (2 Minuten) und 7 Minuten im Schüttler bei 1600 rpm Inkubiert.

Nachfolgend erfolgte ein Zentrifugationsschritt 20 Minuten bei 12000 x g bei 4°C, der das Präparat in drei Phasen auftrennt.

Die oberste, die Gesamt-RNA-beinhaltende Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und mit dergleichen Menge eiskaltem Isopropylalkohol (etwa 500µl) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt.

Anschließend wurde 20 Minuten bei 12000rpm pelletiert und das Pellet in 1ml 70% Ethanol gewaschen, gevortext, wiederum bei 7500rpm und 4°C zentrifugiert.

Nach Entfernen und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet 10 Minuten an der Luft getrocknet und das Eppendorf-Gefäß vorsichtig mit Zellstoff das restliche Ethanol entfernt.

Das Pellet wurde nachfolgend in 10µl Aqua bidest aufgenommen und resuspendiert.

Zur Überprüfung der Reinheit der Präparation auf DNA-Rückstände wurden 2µl RNA (+3µl Aquabidest + 2µl Trypanblau) in einem 0.8%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Als Größenmarker wurden 1µl 16S und 23S (Fa. Boehringer, Mannheim, bakterieller RNA-Marker) mit 3µl Aqua bidest und 2µl Trypanblau aufgetragen.

Zur Aufbewahrung wurden die Gesamt-RNA-Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Das TAE-Agarosegel-Auftrennung erfolgte in einer Pharmacia-Gelelektrophoresekammer bei 120 V und 200 A.

Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung [5g/l Stammlösung, Endkonzentration 0.5µg/l] für zwei Minuten gefärbt. Bei Überfärbung wurde das Gel bis zu 1h in Aqua bidest zur Kontrastverstärkung entfärbt.

Ethidiumbromid interkaliert in DNA und RNA. Bei dickeren Gelen kann es zu einer unspezifischen Anfärbung des Gels kommen, was den Hintergrund anhebt und die DNA-Banden überlagert.

Im Wesentlichen diente die Überprüfung der Aufreinigung der Detektion von DNA-Verunreinigungen. Diese erfordern einen weiteren Zwischenschritt mit DNase-Verdau. Dazu werden bei Bedarf 10U DNase/10µl RNA-Probe der Fa. Boehringer, Mannheim (776 785, 10000 U, 1ml) für 1h bei 37°C im Thermoblock inkubiert.

Reverse-Transskriptase (RT):

Die RT-PCR wurde mit dem RT-PCR-Kit (Fa. Promega) durchgeführt.

Das Prinzip der RT-PCR basiert auf der Anlagerung eines Oligo-dT-Primers an die Poly-Adenin-Sequenzen der Boten-RNAs, deren Umschreiben in copy (c) DNA, die, da auf der mRNA, nur aus umgeschriebenen Exons besteht und die Introns ausgespleisst sind.

Der Oligo-desoxy-Thymidin-Primer stellt nach Anlagerung an die Poly-A-Sequenz am 3'-Ende der RNA- den Startpunkt für die Reverse-Transskriptase dar.

Durch einen Überschuß an desoxy-Nukleotiden wird dabei die RNA in einen einzelsträngigen DNA-Strang zurück-übersetzt.

Dazu werden 2µl Gesamt-RNA (aus den verschiedenen Ansätzen) mit 4.5µl H₂O-bidest, 1µl oligo-dT oder r-Primer [500µg/ml, Endkonzentration 2mM], 4µl 5x Puffer, 4µl MgCl₂ (25mM), NTP (10mM), dTT (Dithioerythiol, 100mM), RNAsin (40U/µl), AMV-RT-Mix (Avian-Myoblastosis-Virus-Polymerase, 3µl) versetzt.

AMV-Mix bestehend aus: 2.0µl H₂O, 0.5µl RNAsin, AMV (0.5µl, Adeno-Megalie-Virus-Polymerase, DNA-Virus).

Diese Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen der Proben in der nachfolgenden Amplifikation zu vermeiden.

Im Thermocycler wurden folgende Einstellungen gewählt:

15 min 65°C (Denaturierung von Doppelsträngen und Primer-Anlagerung)- 42°C- für die Zugabe des AMV-Mixes-45 min 42°C-DNA-Amplifikation- 10min Denaturierung doppelsträngiger DNA.

Der AMV-Mix wird wegen der besseren Ausbeute erst nach der Anlagerung der Primer zugegeben und enthält die DNA-Polymerase.

Die nach der Amplifikation erhaltene Gesamt-DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch in sechs unterschiedlichen Verdünnungen für alle Ansätze ins Gel aufgetragen, um für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion gleiche Mengen an DNA vorzulegen respektive einzusetzen.

Polymerase-Kettenreaktion, PCR:

Die PCR beruht auf der entweder direkten Amplifikation von Original-DNA, wie sie für Genbanken, Sequenzierungen oder kriminaltechnischen Untersuchungen, sowie bei medizinischen Genanalysen eingesetzt wird, oder, wie im vorliegenden Fall, auf der Vervielfältigung von cDNA aus RNA.

Prinzipiell besteht das Reaktionsmuster und die Abfolge der Schritte auf der Anlagerung der Primersequenzen für das gesuchte Gen, die im Gesamtgenom mehr- oder minder spezifisch sind, der Umschreibung der Originalgenesequenz in die Antisense-DNA, der thermischen Trennung der beiden DNA-Stränge, der wiederholten Primeranlagerung von Sense- und Antisense-Primer und

der Wiederholung der Amplifikation und der bislang genannten Schritte allein durch temperaturabhängige Steuerung der Reaktionen im Thermoblock des Minireaktors.

Zur Abfolge der Einzelschritte:

Zunächst werden die Proben 3 Minuten auf 98°C erhitzt, was doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen denaturiert und eine bessere Ausbeute, wegen des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase (sogenannter 'Hot-start'). Als nächstes wird das hitzestabile Enzym, die Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*, der zum ersten Mal 1956 aus dem gleichnamigen Bakterium isoliert wurde und natürlicherweise in Schwefelquellen vorkommt, bei 80 °C zugesetzt.

Anschließend werden die Proben 45 Sekunden bei 94°C gehalten um während der Zugabe renaturierte Proben wieder zu denaturieren, dann erfolgt für 45 Sekunden bei 55°C die Anlagerung der Primer, 60 Sekunden die Elongation der Konsensus-DNA. Während dieser Sequenz befindet sich die Amplifikationskurve noch nicht im linearen Bereich obschon sich die DNA-Menge bei jedem Durchlauf verdoppeln sollte und wird deshalb fünfmal wiederholt (94°C-55°C-72°C, Trennung des Doppelstranges, Anlagerung der Primer, Elongation).

Anschließend werden die gleichen Zyklen in dieser Abfolge dreissig bis fünfunddreissig Mal wiederholt, wobei für jede Elongationsphase der Zyklus um eine Sekunde verlängert wird, da mit steigender DNA-Menge (mathematisch: $F(X) = 2^Y$, mit Y...Zyklus) der Quotient Polymerase/DNA-Menge für das Enzym ungünstiger wird und die Zahl besetzter Promotoren ebenso.

Nach dem letzten Zyklus werden die Proben 10 Minuten bei 72°C zur Restamplifikation gehalten und anschließend auf RT bzw. 8°C heruntergekühlt, um weitere Reaktionen sowie Denaturierungen zu vermeiden.

Bei zu erwartenden Genfragmenten, die 800 bp übersteigen, wird die Elongationszeit auf 90 Sekunden gesetzt.

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden von Beginn an mit Haushaltsgen- (Glc-3-P-DH) und huTNF- α - Primer als Konkurrenzreaktionen durchgeführt.

In den Ansätzen wurden 2 μ l DNA, 28,8 μ l Aqua-bidest, 5 μ l 10xPuffer, 10 μ l Primer (2 x 2 x 5 μ l, sense- und antisenseprimer, hu-TNF- α /hu Glu-3-P-DH), und 4 μ l NTP-Mix (Desoxy-Nukleotide, also Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) mit Mineralöl überschichtet im Thermoblock eingesetzt und nachfolgend die Taq-Polymerase (0.2 μ l in 5 μ l Aqua-bidest = 5.2 μ l) nach drei Minuten zugegeben.

Nach erfolgter Polymerisation wurden 2 μ l-Aliquote der Proben in 1.5, 2 und 2.5 %igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt.

Die besten Ergebnisse wurden mit 2.5 %TAE-Agarosegelen erzielt, da TNF- α und Glc-3-P-DH mit 325 und 298 Basenpaaren außerordentlich eng beeinander liegen. Dafür wurden in Pharmacia Gelelektrophoresekammern als angelegte Spannung 150mV und maximaler Strom 260A gewählt.

Primer:

humaner TNF- α -Primer wurde freundlicherweise von Dr. Christoph Vogel, Abteilung für experimentelle Toxikologie am medizinischen Institut für Umwelthygiene bereitgestellt, Stammkonzentration 4mM, mit 55°C-/ 72°C-/ 94°C-Optima für Primeranlagerung- Elongation (Taq-Polymerase-Arbeitstemperatur), und Doppelstrang-denaturierung, nach Wang et al., 1989).

hu TNF- α -Primer:

5': CAG AGG GAA GAG TTC CCC AG

3': CCT TGG TCT GGT AGG AGA CG

Geräte:

Für die RT-PCR wurden folgende Gerätschaften, Enzyme und Standards verwendet:

Thermocycler: OmniGene Hybaid

Oligonukleotid-Primer: Oligo-dT Promega

15-Thymidin-Nucleotide

β -Actin-Primer

Reverse Transkriptase: Promega

bp-Marker: 16S/23S Boehringer

DNA-Marker: Boehringer

Mg²⁺: Gibco

Tri-Reagent: Sigma

AMV (Avian myoblastosis virus-Polymerase)

DNAsis: verhindert RNA-Abbau durch RNAsen durch Inhibition der RNase

DTT: Dithioerythritol, Fa. Gibco

Taq-Polymerase: Fa. Boehringer

Gelelektrophorese-Kammern und Energiequelle: Fa. Pharmacia Biotech

Agarose: Fa. Roth, Erlangen

Gelelektrophoresekammer: Fa. Pharmingen

Behandlung der Zellen

Wie in den vorhergehenden Experimenten wurden die Zellen in Greiner 4ml Kulturgefäßen nicht (Kontrolle), DMSO (0.1%), mit LPS [10 μ g/ml] 30 Minuten oder 5h PCB 47 [100 μ M] belastet und nach der Exposition 2 Mal HBS gewaschen.

In Parallelansätzen wurden nach 1.5h, 5h, 10, und 16h jeweils ein Ansatz Zellen geerntet und die Boten-RNA und DNA durch Trireagent-Behandlung gewonnen.

3.3.4.6 Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Sorting (FACS-Analysen):

Die FACS-Analysen wurden mit dem Beckton/Dickinson Fluorescence-Activated-Cell-Sorter, (Beckton/Dickinson Corp. San Diego, CA, USA) und cell-quest-software (für Macintosh) durchgeführt.

Die fünf verschiedenen Fluoreszenz-Kanäle wurden wie folgt eingestellt:

	Name:	Absorptionsmaximum:	Verstärkung:	Cytochrom/Meßparameter:
P1	FSC	E 01	1	forewardscatter (FSC) (Vorwärtsstreulicht)
P2	SSC	396	1	sidewardscatter (SSC) (Seitwärtsstreulicht)
P3	FI 1	688	1	Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)
P4	FI 2	643	1	Phycoerythrin (PE)
P5	FI 3	607	1	Tri-Color/Cytochrom/ Propidiumjodid

Die Zellen, die einzeln angesaugt durch den Laserstrahl geschossen und detektiert werden, können gleichzeitig auf fünf verschiedene Parameter überprüft werden: Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie drei verschiedene Fluoreszenzqualitäten.

Auf Kanal 1 wurde das Vorwärtsstreulicht, FSC (= forewardscatter) gelegt, auf Kanal 2 das Seitwärtsstreulicht (SSC). Diese beiden Basalparameter dienen der Vorauswahl von nicht-geschädigten, lebenden Zellen, da im Untergang befindliche Zellen üblicherweise einen hohen Gehalt an Granula im Vergleich zur übrigen

einheitlichen Zellpopulation aufweisen und somit geringere Quantenzahlen an Licht durchlassen und andererseits praktisch kein Seitwärtsstreulicht zeigen.

Es wurden durch diese Vorauswahl Zellen berücksichtigt, deren Lichttransmissions und Absorptionseigenschaften zwischen 300 und 1000 Lux pro Zelle für das Vorwärtsstreulicht und 0 bis 1000 Lux pro Zelle für das Seitwärtsstreulicht liegen.

Verschiedene Zelltypen haben erfahrungsgemäß und aufgrund struktureller und funktioneller Unterschiede verschiedene Eigenschaften in Bezug auf die Lichtstreuung: chromaffine Zellen etwa zeigen grundsätzlich ein höheres Seitwärtsstreulicht und geringere Lichttransmission, da sie viele Katecholamine enthaltende Granula speichern. Ähnliches gilt für Makrophagen, die verhältnismäßig viele Speicher- und vor allem als Feßzellen Verdauungsvesikel wie Lysosomen und Phagosomen beinhalten, Lymphozyten dafür wesentlich weniger.

Durch das Setzen eines Tores ('Gates') wurden die Zellen ausgewählt, deren Eigenschaften in Bezug auf diese beiden Parameter nicht lebendige Zellen ausschließt. Diese Eigenschaft bleibt durch Antikörpervorbehandlung mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern unangetastet.

Im Folgenden wurde in Fluoreszenzkanal 1 auf Fluorescein-Isothiocyanat-positiv-markierte Zellen selektiert (auf Fluoreszenz-Kanal 2 kann gleichzeitig auf einen weiteren Marker selektiert werden, Fluoreszenzhöhe als Maß für Absorption bei der Maximalwellenlänge des betreffenden Markers). Die Daten wurden in Form von Häufigkeitshistogrammen aquiriert und im Graph-pad-prism-Programm ausgewertet.

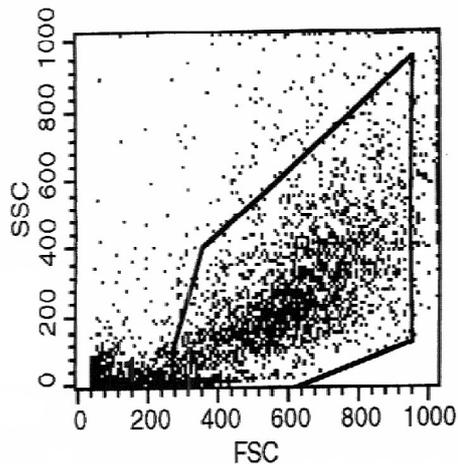


Abbildung 9: Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht-Sortierung von Humanmakrophagen zur Selektion im Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sorting. In der Abbildung ist die Vorselektion der gesamten Makrophagenpopulation für FSC und SSC dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle. Pro Ansatz wurden jeweils 2×10^5 Zellen getestet.

3.3.4.7.1 FITC-Markierung von anti-humanen P2X₇- und anti-humanen P2X₁- Rezeptor-antikörpern

Die FITC-Markierung von hu P2X₁/P2X₇-Antikörpern wurde mit einem modifizierten Protokoll der Fa. Calbiochem für geringe Proteinmengen durchgeführt:

Prinzip der Markierung von Proteinen/ Antikörpern mit Fluorescein-Isothiocyanat:

15 bzw. 30µg P2X₁- bzw. P2X₇- des kommerziell nicht markiert erhältlichen Antikörper-Lyophilisats (Fa. Alomone Labs, Jerusalem, Israel) wurden mit 30µl Aquabidest rekonstituiert und 1: 1000 in PBS verdünnt.

Zur Entfernung der enthaltenen Salze und NaN₃ wurden die Antikörper-Suspensionen in einem 50x Centricon Mikrokonzentrator bei Raumtemperatur 75 Minuten bei 3000g zentrifugiert.

Die Konzentrate wurden anschließend mit 0.5 mg/ml FITC in PBS (pH 7.3) bei Raumtemperatur bei 1800 rpm für 5 Minuten geschüttelt.

Nach Zugabe von 1.8 ml PBS wurden die Proben anschließend bei 4°C im Schüttler über Nacht inkubiert.

Die eingesetzte FITC-Menge lag bei 50µg/ml pro 30µg Antikörper, d.h. 3.2fach höher als im Markierungs-Protokoll empfohlen. Solch geringe Mengen Antikörper sind nach Herstellerangaben für das Markierungs-Kit nicht zu empfehlen. Allerdings sind FITC-markierte humane P2X-Antikörper kommerziell (noch) nicht erhältlich, die Antikörper selbst sind ausgesprochen teuer.

Nach 16h Inkubation wurde die Kopplungsreaktion durch Zugabe von 2ml PBS gestoppt und 2 x bei 3000 g für 75 Minuten im 100er Centricon Mikrokonzentrator gewaschen und aufkonzentriert.

(1) Nach dem ersten Waschschrift wurde das Konzentrat (ca. 750µl) auf 3ml mit PBSA (0.1%) aufgefüllt und zentrifugiert und die gelabelten Antikörper in PBSA/1%NaN₃ direkt aufgenommen.

Zur besseren Ausbeute wurde das Mikrosieb mit 1ml Methanol gespült (2) um überschüssiges FITC zu entfernen und die Wiederfindungsrate des Antikörpers zu erhöhen und 70 Minuten bei 3000g abzentrifugiert, das Methanol verdampft und (mit dem Aliquot aus 1) gepoolt.

(3) Aus 1 und 2 erhaltene Volumina markierten Antikörpers:

P2X1: 60µl + 60µl (aus 2), nach Verdampfen und Poolen auf insgesamt 80µl eingestellt.

P2X7: 60µl + 20µl (aus 2), ----- "----- .

Überprüfung der Antikörper-Wiederfindungsrate und der Markierungseffizienz:

Die Menge an FITC in den Proben pro Protein [Mole FITC/Mole Protein, dimensionsloser Quotient] wurde photometrisch bei 495nm (FITC-Absorption) und 280nm (Proteinabsorption) bestimmt nach folgender Gleichung:

$$\text{Molare ratio [F/P]} = \text{Mole [FITC]} / \text{Mole [Protein]} = 2.77 \times A_{495} / A_{280} - [0.32 \times A_{495}]$$

mit c [FITC-Antikörper-Konjugat]: Antikörper [mg/ml] für IgG-Konjugate:

$$c [\text{FITC-Ak/Ak}] = A_{280} - (0.32 \times A_{495}) / 1.4$$

<u>Absorptionen:</u>	495nm:	280nm:
P2X ₇	0.0037	0.1091
P2X ₁	0.0040	0.1091
P2X ₇ -MetOH:	0.0002	0.1091
P2X ₁ -MetOH:	0.0	0.0512

und daraus folgende Konzentrationen des Antikörper-FITC-Konjugates:

P2X₁-Antikörper:

$$\text{Molare F/P} = 2.77 \times 0.0040 / 0.1 - (0.32 \times 0.0040) = 0.112236$$

$$\begin{aligned} \text{Antikörper-FITC-Konjugat: } & 0.1091 - (0.32 \times 0.0040) / 1.4 = 0.077 \text{ mg/ml Konjugat} \\ & = 77 \mu\text{g/ml} = 6.16 \mu\text{g gelabelter Antikörper/ } 80 \mu\text{l} \end{aligned}$$

P2X₁- Antikörper MetOH:

$$\text{Molare F/P} = 2.77 \times 0 / 0.0512 - (0.32 \times 0) = 0 / 0.189 = 0$$

$$\begin{aligned} \text{Antikörper-FITC-Konjugat: } & 0.0512 - (0.32 \times 0) / 1.4 = 0.03657 \text{ mg/ml Konjugat} \\ & = 36.57 \mu\text{g/ml} = 2.1942 \mu\text{g gelabelter Antikörper/ } 60 \mu\text{l} \end{aligned}$$

P2X₇-Antikörper:

$$\text{Molare F/P} = 2.77 \times 0.0037 / 0.1091 - (0.32 \times 0.0037) = 0.095$$

$$\begin{aligned} \text{Antikörper-FITC-Konjugat [mg/ml]: } & 0.1091 - (0.32 \times 0.0037) / 1.4 = 0.077 \text{ mg/ml Konjugat} \\ & = 77 \mu\text{g/ml} = 6.16 \mu\text{g markierter Antikörper/ } 80 \mu\text{l} \end{aligned}$$

P2X₇-Antikörper-MetOH:

$$\text{Molare F/P} = 2.77 \times 0.0002 / 0.1091 - (0.32 \times 0.0002) = 0.0051$$

$$\begin{aligned} \text{Antikörper-FITC-Konjugat: } & 0.1091 - (0.32 \times 0.0002) / 1.4 = 0.078 \text{ mg/ml Konjugat} \\ & = 78 \mu\text{g/ml} = 4.68 \mu\text{g gelabelter Antikörper/ } 60 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Gesamtwiederfindungsrate:

Menge FITC-markierter Antikörper/ Menge eingesetzter Antikörper:

$$\text{P2X}_1: 8.35 \mu\text{g} / 30 \mu\text{g} = 0.278 = 27.8\%$$

$$\text{P2X}_7: 10.84 \mu\text{g} / 15 \mu\text{g} = 0.723 = 72.3 \%$$

Die Wiederfindungsrate der Antikörper war ausgesprochen unterschiedlich, warum bleibt fraglich.

Die Antikörper wurden in fünf verschiedenen Konzentrationen von 1:100 bis 1:5 an unbehandelten und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Humanmakrophagen mit jeweils 8000 bis 14000 Zellen getestet.

In der höchsten Konzentration des Antikörpers zeigen beim P2X₁-Antikörper 66.41% der lebend gegateten Zellen eine positive Markierung im Kontrollansatz und 67.76% nach 5h PCB 47. Beim P2X₇-Rezeptorantikörper sind in der Kontrolle 50.71% der lebend gegateten Zellen positiv markierbar, nach PCB 47-Vorbehandlung 57.69%.

Diese Ergebnisse können lediglich als Hinweise verstanden werden, da dasselbe Experiment mit gleichen Antikörperkonzentration und mit Isotypkontrolle nicht wiederholt wurde.

Die Fluoreszenzmarkierung des Antikörpers mit geringen Mengen Protein ist aber möglich.

Behandlung der Zellen:

Die Makrophagen wurden in 1ml Greiner Inkubationskammern nicht (Kontrolle) oder in 0.1% DMSO oder 5h PCB 47 inkubiert, zweimal HBS gewaschen und die Zellen mechanisch vom Boden gelöst 2 Mal durch 1 Minütige Zentrifugation in HBS bei 14000 rpm in einer Sorvall Tischzentrifuge gewaschen und in Antikörperkonzentrationen 1:5, 1:10, 1:25 , 1:100 und 1:500 für 10 Minuten inkubiert, durch Zentrifugation in HBS gewaschen und nachfolgend in 1ml HBS aufgenommen und im Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer wie eingangs beschrieben betrachtet.

Zum Vergleich wurden außerdem nicht-Antikörper markierte Zellen gleichfalls studiert.

3.3.4.8 Lebendfärbung der Makrophagenkultur mit monoklonalem α -hu CD 11c-Antikörper/ Biotin-Streptavidin-Cytochrom:

Der monoklonale α -hu-CD11c-Antikörper erkennt die 150kDa α -Untereinheit des CD11/CD18-Komplexes der β 2-Integrin-Familie (Antikörper: Fa. Sigma Immuno Chemicals, Saint Louis, Missouri aufgereinigtes Maus-Immunglobulin, Klon 3.9).

Die Färbung wurde nach Testen an fixierten Zellen an lebenden Präparaten durchgeführt, um eine Veränderung der Oberflächenepitope durch die Fixierung zu verhindern und amplifiziert mit Streptavidin-Cytochrom, mit einem breiten Absorptionsspektrum zwischen 400 und 520 nm und einem Emissionsmaximum von 670 nm (im Long-pass-Fluoreszenzfilter betrachtet).

Die Fixierung wurde in Anlehnung an die Methode von Mary Osborne in: 'Cell biology', zweite Ausgabe, Band 2, herausgegeben von Julio E. Celis) durchgeführt.

An verschiedenen Kulturgefäßen wurden Antikörperverdünnungen 1:100 und 1:25 getestet. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Antikörper, nur mit dem Cytochrom-Streptavidinkomplex inkubiert.

Durchführung:

1 x 10⁶ plattierte Zellen wurden mit 300 μ l Antikörper [1:25 oder 1:100], 2 μ g/ml bzw. 0.5 μ g/ml für 60 Minuten bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert, 3 x im Tauchbad in Dulbeccos PBS und 1 x 3 Minuten in PBS gewaschen und in einer feuchten Kammer für 20 Minuten bei 4°C mit dem Streptavidin-Cytochrom-Konjugat [1:100], 300 μ l pro Ansatz inkubiert oder im Kontrollansatz ohne Antikörper nur mit Streptavidin/Cytochrom.

Anschließend wurden die Zellen wiederum 3 x im Tauchbad und 1 x 3 Minuten mit PBS gewaschen, auf einem Filterpapier vom restlichen PBS befreit und 15 Minuten mit -20°C kaltem Aceton auf Eis fixiert.

Nach einmaligem Spülen in Aqua dest. wurden die Zellen in Moviol eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

Nach Austesten verschiedener Fixierreagentien löscht eine Fixierung mit reinem Ethanol bzw. 95% Ethanol/ 5% Essigsäure die Cytochrom-Fluoreszenz.

Die Bildaquirierung wurde mit demselben bildgebenden Verfahren wie die Immunhistochemie der Stickstoffoxydsynthese durchgeführt (Olympus BX60-Fluoreszenzmikroskop und Sony DXC 950 PBCCD Farb-VideoKamera).

Zur Bild-Aquisition wurden die Zellen einerseits im Phasenkontrast Phase 3 bei 100-facher Vergrößerung im Ölimmersionsobjektiv aufgenommen und ein Helligkeitsabgleich bei Phasenkontrastaufnahmen durch AWB-Hintergrundkorrektur durchgeführt sowie die Bildschärfe über Filter 1 korrigiert.

Software: analySIS 3.0, '98, soft imaging system corp 1675 Carr St.-Suite 105 N
Lakewood, CO 80215, United states of Amerika

Für die Aquirierung der Fluoreszenzaufnahmen wurden dieselben Zellen mit Aperturblende 0 und Fluoreszenzfilter Cy3 mit einer Filterlänge im Langpass-Filter > 620nm aufgenommen. Zur Quantifizierung der CD11C-positiv markierten Zellen wurden anschließend im Computerprogramm Fluoreszenzbild und Phasenkontrastbild überlagert. Der prozentuale Anteil positiv markierter Zellen wurde bei 20 x facher Vergrößerung im Phasenkontrast (Phase 1) im gleichen Verfahren pro Gesamtzellen in mindestens fünf verschiedenen Ansätzen bestimmt und statistisch im Graph-pad-prism-Programm ausgewertet.

3.3.4.9 Gesamtnitrit-Freisetzungs-Assays zur Bestimmung der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese-Funktion nach PCB 47

Experimente zu Funktion der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese bei Humanmakrophagen wurden entweder als Gesamt-NO-Bestimmung in einem Enzym-gekoppelten-Immuno-Assay (ELISA) nach einem Protokoll der Fa. Calbiochem durchgeführt mit Umsetzung des freigesetzten Nitrats durch die Nitratreduktase und anschließender Griess-Reaktion oder ohne Nitratreduktase zur Bestimmung der PCB-Interaktion mit der Griess-Nitrit-Bestimmung durch Einsatz von 5µM Nitrat/verschiedenen PCB-Konzentrationen und anschließender Griess-Reaktion.

Der Gesamt-NO-Assay ist in etwa doppelt-sensitiv im Vergleich zur einfachen Nitritbestimmung nach der Griess-Reaktion, wie aus dem Vergleich der Standard-Kurven pro Absorption bei 540nm ermittelt werden konnte.

Prinzip:

Der colorimetrische Stickstoffoxydsynthese-Assay (Fa. Calbiochem, Reaktionsschritte 1 bis 3) und die Nitritbestimmung im Überstand (Schritte 2 und 3) beruhen beide auf der Umsetzung endogen produzierten NOs durch die Griess-Reagentien 1 und 2 zur einem Azofarbstoff, der bei 540nm photometrisch nachgewiesen wird.

Griess-Reaktionen:

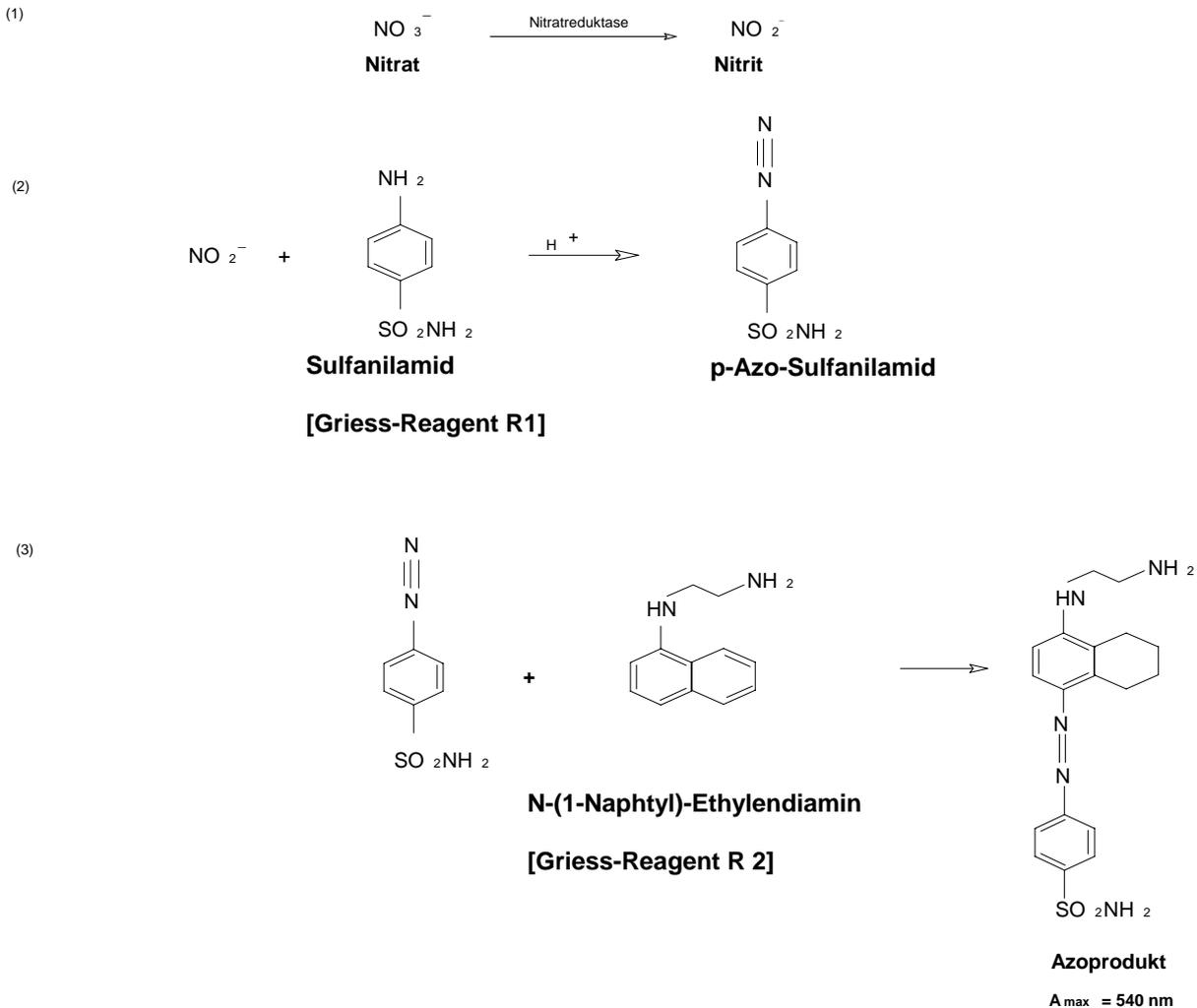


Abbildung 10: Reaktionsschema zum Nachweis von Gesamtnitrit durch die Griess-Reagentien 1 und 2. Im ersten Schritt wird durch die Nitratreduktase sämtliches Nitrat zu Nitrit reduziert. Dieses reagiert mit dem Griess-Reagenz 1 zum p-Azo-Sulfanilamid-Zwischenprodukt, das in Schritt drei mit dem Griess-Reagenz 2 zum fluorimetrischen Azoprodukt reagiert, das bei 540nm detektiert wird.

Nitrit und Nitrat sind in vivo die Produkte des durch die Stickstoffoxydsynthese erzeugten NO. Da die Mengenverhältnisse beider Produkte variieren, wird als Index für produziertes NO der Nitritgehalt nach Umsetzung des endogenen Nitrates durch die Nitratreduktase bestimmt. Da NADPH mit dem

Griess-Reagent 1 interagiert, wird überschüssiges NADPH durch eine Kopplungsreaktion mit Lactatdehydrogenase weggefangen.

Dies ist bei der einfachen Griess-Reaktion nicht vonnöten, da keine NADPH-abhängige Reaktion vorliegt.

Bestimmung des NO-Gehaltes im Kultumedium:

Da laut Assay-Hersteller-Angaben das RPMI-Kulturmedium erhöhte Mengen NO basal enthält, wurden die Proben zum einen unverdünnt und in 1 : 3 facher Verdünnung im Calbiochem-Assay eingesetzt.

Für die Griess-Reaktionen wurden die Zellen testweise in reiner Hanks-gepufferter Saline (HBS) über fünf Stunden gehalten und anschließend ein Trypanblautest bei unbehandelten und behandelten adhären Zellen mit 0.04% Trypanblau durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen nach Abnahme eines Aliquots zur Nitritbestimmung fünf Minuten mit Trypanblau im Schüttler inkubiert, zweimal mit HBS gewaschen und bei 20-facher Vergrößerung ein Gesichtsfeld im Mikroskop ausgezählt.

Durchführung:

Bestimmung der PCB-Interaktion mit dem Griessreagenz:

in einer zellfreien 96-well-Kulturgefäßplatte wurde in deionisiertem Wasser eine Natriumnitrat-Standardkurve als Doppelansätze (0.5 bis 100µM Natriumnitrat) erstellt und gegen Ansätze mit 10µM Natriumnitrat und steigender PCB 47-Konzentration (100µM bis 0.185µM, Verdünnungsreihe) gemessen (Endkonzentration Nitrat: 5µM).

100µl Standard oder Probe wurden mit 100µl Griess-Reagenz (zu gleichen Anteilen Reagenz 1 und 2) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 540nm bestimmt.

Im zellfreien System zeigte sich keinerlei Interaktion des PCB 47 mit den Griess-Reagentien, das bedeutet, der aus der Standard-Kurve ermittelte Absorptionwert für 10µM Natriumnitrat blieb auch bei steigender PCB-Konzentration konstant.

Griess-Reagenz 1 enthält 0.2% Naphtylenethlendiamid x 2 HCl (0.2g/100ml), Griess-Reagenz 2 besteht aus 2% Sulfanilamid in 5% H₃PO₄ (1g/100ml). Diese wurden unmittelbar vor Zugabe 1:1 gemischt.

(a) Calbiochem-Assay zur Gesamtnitritbestimmung:

Jeweils eine Kulturschale pro Ansatz mit 1.5×10^6 Zellen [d9] wurde mit [10 µg/ml] Lipopolysaccharid aus E. Coli in Kulturmedium über 16h bei 37°C im Brutschrank inkubiert (zur Stickstoffoxydsynthese-Induktion).

Anschließend wurde 2 x in Na⁺-HBS gewaschen und für fünf Stunden (1:1 Medium/Na⁺-HBS) mit

verschiedenen Konzentrationen PCB 47 inkubiert. Interne Kontrollen waren ein Ansatz ohne LPS-Vorbehandlung und ein weiterer Ansatz mit LPS-Behandlung und ohne anschließende PCB-Inkubation.

Das produzierte Gesamt-NO wurde nachfolgend in dreifach-Bestimmungen im colorimetrischen Assay gemessen.

10 Minuten nach Zugabe von Griess-Reagent II wurde die Absorption bei 540 nm bestimmt und die Menge freigesetzten NOs aus der Standardkurve ermittelt.

(b) Nitrit-Bestimmung nach Griess:

In 96-Well-Flachboden-Kulturgefäßen (Fa. Beckton-Dickinson) kultivierte (2×10^5 Zellen/Vertiefung) von Monozyten- abgeleitete Humanmakrophagen wurden über fünf Stunden mit verschiedenen PCB 47-Konzentrationen in Sechsfachansätzen inkubiert (50 µl/Vertiefung), diese gepoolt und anschließend in Dreifachbestimmungen gegen eine in HBS erstellte Natriumnitrat-Standardkurve (0.5 bis 100 µM, Doppelan-sätze) 10 Minuten nach Zugabe der Griess-Reagentien die Absorption bei 540 nm im ELISA-Reader gemessen.

Für die Aufbewahrung der Originalproben können diese in mit 1M NaOH (100 µl für 1 ml Probenvolumen) beschichteten Eppendorfgefäßen bei -20°C für eine Woche gelagert werden.

Zur Bestimmung des zellulären Gesamtnitrit-Spiegels wurden die Zellen in 4 ml Kulturgefäßen 16 h mit [10 µg/ml] LPS in reinem Medium vorinkubiert, nach 16 h das Medium gegen Medium/HBS ausgetauscht und fünf Stunden mit 0.1% DMSO oder verschiedenen PCB-Konzentrationen inkubiert, und ein Aliquot zur Nitritbestimmung entnommen.

Die Vorbehandlung der Zellen in 96-Multiwell-Platten für die colorimetrischen Assays erfolgte entsprechend.

Um Serumeffekte auszuschließen wurden entsprechende Kontrollen über den angegebenen Zeitraum mitgeführt.

3.3.4.10 Enzym-Immunoassay (EIA) für zyklische Nukleotide

(a) zyklisches Adenosinmonophosphat, cAMP:

Der Assay wurde nach dem Nichtacetylierungs-Protokoll 3 für intrazelluläres cAMP (Biotrak-Assay, Fa. Amersham) durchgeführt. Die Zellen wurden für fünf Stunden in einer 96-well-Zellkulturplatte der Fa. Beckton/Dickinson in 200µM 1:1 Zellkulturmedium/ Na⁺-Hanks-gepufferter Saline (Na⁺-HBS, s.o.) versetzt mit verschiedenen PCB 47 Konzentrationen in Dreifachansätzen von 10nM bis 100µM inkubiert. Die PCB-Wirkung auf den stimulierten cAMP-Level wurde getestet, indem den Zellen 30 Minuten vor PCB 20µM Forskolin, ein Diterpen, das unspezifisch die Adenylatzyklasen stimuliert, zugesetzt wurde.

In Parallelansätzen wurden 5h PCB-behandelte Zellen 100 Sekunden mit 100µM Uridintriphosphat stimuliert, das laut Literatur die Adenylatzyklase triggert und zum Vergleich stereospezifischer PCBs 5h mit 20µM PCB 77 inkubiert und in einem weiteren Ansatz ebenfalls UTP stimuliert.

Als weitere Konzentrations-Effekt-Beziehung wurden Zellen in Doppelansätzen 30 Minuten mit 10nM KN-62, einem Inhibitor der Calcium-abhängigen Calmodulinkinase II inkubiert, 5h mit PCB 47 [10nM bis 100µM] inkubiert und nachfolgend ebenfalls mit 100µM UTP stimuliert.

Testprinzip:

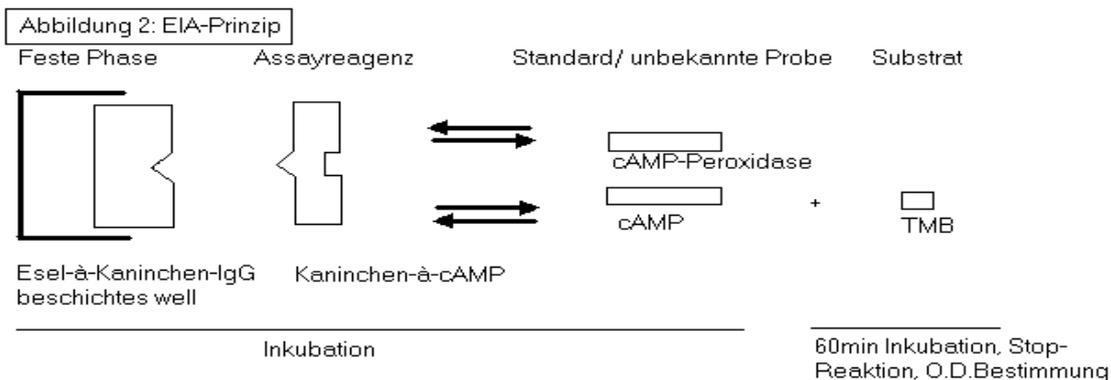
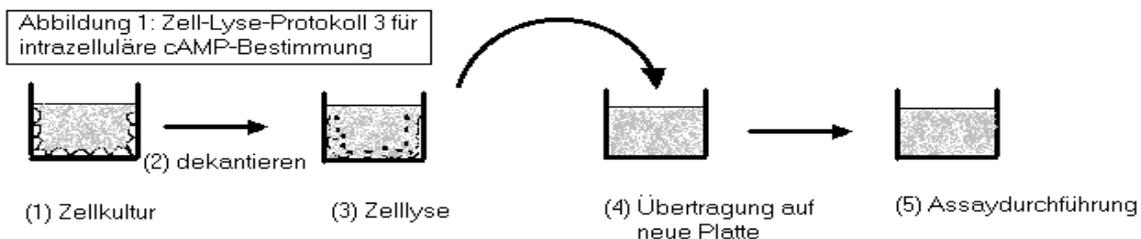


Abbildung 11: Durchführung und Testprinzip des EIAs für zyklische Nukleotide, hier cAMP.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde 2 x HBS gespült, mit dem Assay-Kit-Lysis-Reagenz 1 lysiert und die Überstände zur Bestimmung des cytosolischen cAMP-Gehaltes in eine mit Esel-

anti-Kaninchen-IgG-beschichtete 96 well-Platte überführt, mit Kaninchen-cAMP-Antiserum inkubiert und in einer Konkurrenzreaktion mit Peroxidase-gekoppeltem cAMP inkubiert. Nach 4 maligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Saline/0.05%Tween 20 wurden die Lysate 60 Minuten mit Tetramethylbenzidin/ H₂O₂/ 20% Dimethylformamid inkubiert und die Farbreaktion nach Stoppen durch 1M H₂SO₄ bei 450nm gemessen.

Um einen Abbau des zytosolischen cAMP während der Inkubationszeiten zu verhindern, wurden in allen Ansätzen die cAMP-abhängigen Phosphodiesterasen mit 100µM Isobutyl-Methylxanthin inhibiert.

Das Protokoll liefert in einer Konkurrenzreaktion umso höhere Fluoreszenzwerte, je weniger zyklisches Nukleotid in den Proben enthalten ist.

(b) zyklisches Guanosinmonophosphat, cGMP

Das Testprinzip für zyklisches cGMP ist das gleiche wie für cAMP, und enthält als Assayreagenz Kaninchen-à-cGMP-Antikörper der IgG-Fraktion und als Standard für die Kompetition cGMP-gekoppelte Peroxidase.

Im Gegensatz zum cAMP-Assay wurde der cGMP-Assay im Acetylierungsverfahren für die Messung des intrazellulären cGMP (Assay-Protokoll 3) mit höherer Empfindlichkeit (2 bis 512 fmol/Ansatz) durchgeführt.

Nach der Lyse der Zellen wurden diese wie auch die verwendeten Standards mit 10% Acetylierungsreagenz (1:2 Säureanhydrid: Triethylamin) für 5 Minuten acetyliert und nachfolgend 50µl Aliquots in die Mikrotiter-Platte eingesetzt.

Die Messung des intrazellulären cGMP liefert ein unmittelbares Äquivalenz für das von den Zellen produzierte NO, da dieses die Guanylatzyklase triggert.

Zur Bestimmung der zyklischen Nukleotide wurden die Zellen aller Ansätze über die gesamte Versuchsdauer in 100µM Isobutyl-Methyl-Xanthin und 1:1 v/v Medium/HBS mit den Schadstoffen gehalten.

Bestimmung der Basallevel an zyklischen Nukleotiden erfolgte anschließend direkt im ELISA-Reader bei 630nm. Nach einer Stunde wurde die Farbreaktion mit 1M H₂SO₄ gestoppt und bei 450nm die cAMP-Werte aus der Eichkurve abgelesen. Eine in den Assays geringere Farbreaktion bedeutet nach der Konkurrenzreaktion mit HRP-gekoppeltem Standard einen höheren Gehalt an zyklischen Nukleotiden.

3.3.4.11 Chemikalienliste/Basischemikalien:

* PCBs:

PCB 47 (2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl) MW: 292.00 Ultra Scientific

PCB 77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl) MW: 291.99 Promochem & Riedel de Haen

* NO-Donatoren:

S-Nitroso-N-acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP): Alexis-Chemikals

* LPS:

Lipopolysaccharid (LPS) von E.Coli: Sigma

* Antikörper:

(1)polyklonaler Kaninchen à Mausmakrophagen-iNOS aus Antiserum (210/504-R100), 1:1000, Fa. Alexis Biochemicals, D-35305 Grünberg. Spezifität: Aminosäurereste 1131-1144 mit einem zusätzlichen Cysteinrest N-terminal. Ausgetestet 1: 500 und 1:1000, erkennt hu, mu und ra iNOS, aber nicht n- oder e-NOS.

(2)sekundäres Ziege à Kaninchen-IgG-Antiserum, Fa.Sigma

(3)monoklonaler à hu CD 11c-Biotin, getestet 1:100/1:25, Fa. Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

aufgereinigtes Maus-Immunglobulin, Klon 3.9

Der monoklonale à-hu-CD11c-Antikörper erkennt die 150kDa a Kette des CD11/CD18-Komplexes der β 2-Integrin-Familie.

(4) à hu P2X₁-Antikörper 30µg/ml Alomone Labs, Jerusalem

(5) à hu P2X₇-Antikörper 15µg/ml Alomone Labs, Jerusalem

* Calcium-Indikator-Farbstoff:

Fura-2-Acetomethylester (Fura-2AM): Sigma

* Purine, Purinderivate und Pyrimidine:

2',3'-o-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP (bz-ATP) MW: 715.40 Menge 25mg: Sigma

3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) MW: 222.20: Sigma

Adenosin 5'-Diphosphat (ADP) 427.22: Sigma

Adenosin 5'-Triphosphat (ATP, Na⁺-Salz) MW: 551.10: Sigma

AMP-CPP (ab-Methyladenosin 5'-Triphosphat) MW: 505.20: Sigma

AMP-PCP (bg-Methyladenosin 5'-Triphosphat) MW: 549.20: Sigma

Dibutyryl-cAMP (dibutyry-zyklisches Adenosinmonophosphat) MW: 491.40: Sigma

Uridin 5'-Triphosphat (UTP) MW: 484.10: Sigma

Uridin 99% MW: 244.20: Sigma

Uridin-5'-diphosphorsäure Trinatriumsalz (UDP) MW: 470.11: Aldrich

* **Inhibitoren:**

unspezifische P2X und P2Y-ATP-Rezeptor-Inhibitoren:

Suramin MW: 1429.20 Vendor: Calbiochem

unspezifische (P2Y)-ATP-Rezeptor-Inhibitoren:

XAMR 0721, MW: 643.40 Vendor: Calbiochem

Calcium-Calmodulinkinase-Inhibitoren:

KN-62 MW: 721.90 Vendor: Calbiochem

cAMP-Agonist:

8-Bromoadenosin 3',5'-zyklisches Monophosphat (8-Br-cAMP) MW: 430.10: Sigma

cGMP-Agonist:

8-Bromoguanosin 3',5'-zyklisches Monophosphat (8-Br-cGMP) x Na MW:423.10: Alexis

induzierbare-Stickstoffoxydsynthase-Inhibitoren:

N^G-Amino-L-arginin x HCl (L-NAA.HCl, NAA) MW:190.20: Alexis

Kaliumkanalblocker:

3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP) MW: 109.10: Sigma

Caesiumdichlorid (CsCl₂) MW: 168.40: Serva

Tetraethylammonium Chlorid (TEA-CL): Fluka

Tetraethylammonium-Hydroxyd (TEA-OH): Sigma

Calciumkanalblocker:

Cadmiumdichlorid (CdCl₂), 1µM, Serva

Blocker des Dihydropyridin-sensitiven L-Typ-Calciumkanals:

Nifedipin MW: 346.34:RBI

Natriumkanalblocker:

Tetrodotoxin (TTX): Sigma

Blocker der Endoplasmatischen Calciumpumpe:

Thapsigargin MW: 650.80: Sigma

* **Assay-Kits:**

NO-Freisetzungs-Assay: Nitric Oxide Synthase Assay Kit: Calbiochem

TNF-Freisetzungssassay, *Sandwich-ELISA:* primärer Antikörper zum coating der Vertiefungen AK
(61E71, s.a. Schins/Borm, Occup. and environm. Medicine 1995)
primärer Sandwich-Antikörper: Kaninchen à humuanes TNF α , IgG-Fraktion
2nd: Ziege à Kaninchen IgG

Fluorescein-Kopplungs-Kit:*Fa. Calbiochem*

induzierbare NO-synthase-Nachweis:*Vectastain-ABC-Kit, Ziege anti Kaninchen, (Vector-Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 USA)*

PCR (Polymerase-Kettenreaktion)-Kit: *Boehringer Mannheim*

zyklische Nukleotid-Assays:

cAMP-Immunoassay, *Biotrak by Amersham Pharmacia Biotech, UK Ltd., Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, England, Code Nr. RPN 225*

cGMP-Immunoassay, *Biotrak by Amersham Pharmacia Biotech, UK Ltd., Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, England, Code Nr. RPN 226*

3.3.4.12 Fotos

Alle in der Arbeit dargestellten Aufnahmen von Zellen sind mit den in den jeweiligen Abschnitten erwähnten Mikroskopen und Einstellungen erstellt worden und Kamera-unterstützt zur weiteren Auswertung über ein Bildverarbeitungsprogramm (Software: analySIS 3.0, 1998, soft imaging system corporation 1675 Carr St.-Suite 105 N, San Diego, USA) eingelesen worden. Die Aufnahmen zur Immunhistochemie wurden in ein Scannerprogramm (Image Pals 2, Version 2.0, 1992-1995, Ulead systems inc., San Diego, Ca, USA) eingelesen und direkt in den vorliegenden Text importiert. Die elektronenmikroskopische Aufnahme wurde freundlicherweise von Frau Dr. D. Hoehr, Abteilung für experimentelle Toxikologie am Medizinischen Institut für Umwelthygiene, zur Verfügung gestellt.

3.3.4.13 Statistik

Die Statistik wurde auf der Grundlage der im Graph-Pad-Prism-Programm zur Verfügung stehenden Gleichungen und Analyseprogramme durchgeführt.

Alle Resultate sind Angaben für mindestens drei voneinander unabhängige Versuche mit Standard-Irrtumswahrscheinlichkeiten (0-Hypothese: 95% Konfidenzintervalle der einfachen quadrierten Standardabweichungen, SQ).

Zum Vergleich verschiedener Behandlungen in der Calciumspektrofluorimetrie wurden die Ratios der maximal durch ATP-hervorgerufenen Calciumspiegeländerungen für jede einzelne Zelle ermittelt. Anschließend wurde eine einseitige Anova-Varianzanalyse durchgeführt, die in den Kurven dargestellten Konzentrations-Effektbeziehungen wurden nach einem mathematischen Modell nicht-linearer Regression für halblogarithmische Darstellung angepasst.

Zum Vergleich verschiedener Kurvenanpassungen einer Behandlung wurde ein nicht-parametrischer Test durchgeführt, zum Vergleich der Anpassungen verschiedener Behandlungen ein F-Test.

Für die Varianzanalyse wurde ein p-Wert < 0.05 als signifikant betrachtet.

Die Anpassung für Zwei-Bindungsstellen liefert K_D -Werte im negativen Bereich, da das Programm extrapoliert, was pharmakologischer Unsinn ist. Alle dargestellten Konzentrations-Effektbeziehungen wurden deshalb halblogarithmisch dargestellt und zum statistischen Vergleich einem F-Test unterzogen obwohl die Anpassung in den Modellen einen zweiphasigen Verlauf der Konzentrations-Effektbeziehungen suggeriert. Um auf diese Eigenschaften der Kurven einzugehen, wurde eine linearisierte Auftragung nach Scatchard angewendet, obwohl diese streng genommen nur für gleiche Standard-Abweichungen gilt.

Der F-Test ist ein statistisches Verfahren zum Kurvenvergleich der gleichen nicht-linearen Regression verschiedener Behandlungen und berücksichtigt die Summe der Quadrate über den Standardabweichungen und die Freiheitsgrade der optimalen Kurvenanpassung für einerseits

beide separaten Kurven (Kontrolle und Behandlung) im Vergleich zu einer theoretisch angepassten Kurve der Kombination aus beiden (also einer Regression durch die Datenpunkte für Kontrolle+Behandlung) nach der Gleichung:

$$F = \frac{\text{Differenz (SQ}_{\text{kombiniert}} - \text{SQ}_{\text{separat}}) / \text{Differenz (Freiheitsgrade}_{\text{kombiniert}} - \text{Freiheitsgrade}_{\text{separat}})}{\text{(Summenquadrate separat} / \text{Freiheitsgrade separat)}}$$

und ist bei einem Wert $F \geq 3$ auf Signifikanz zu testen.

3.3.4.14 Index der verwendeten Methodik in den Darstellungen der Versuchsansätze:

Alle im Ergebnisteil dargestellten Versuche und Grafiken enthalten als Abkürzung die verwendete Methodik:

CSF.... Calcium-Spektrofluorimetrie

IHC.....Immunhistochemie

PC..... patch-clamp

EM.....Elektronenmikroskopie

LM..... Lichtmikroskopie

IF..... Immunfluoreszenz

CA..... Cytokin-Assay

FA..... FACS-Analyse

PCR... Polymerase-Kettenreaktion

FIA..... fluorimetrischer Assay

4. Ergebnisse:

4.1. Humanmakrophagen:

4.1.1 Charakterisierung der Zellkultur humaner mononukleärer Phagozyten:

Nach Literaturdaten (C. Eder et al., Herstellerangaben für Oberflächenepitope bei Humanmakrophagen Fa. Seromed, Zwilling/Eisenstein) und morphologischen Kriterien wurde die Kultur peripherer Blutmonozyten-abgeleiteter Humanmakrophagen elektrophysiologisch, immunologisch und morphologisch charakterisiert.

4.1.1.1 elektrophysiologisch: Entwicklung eines Kaliumkanalprofils der Zellen in Abhängigkeit vom Kulturzeitraum:

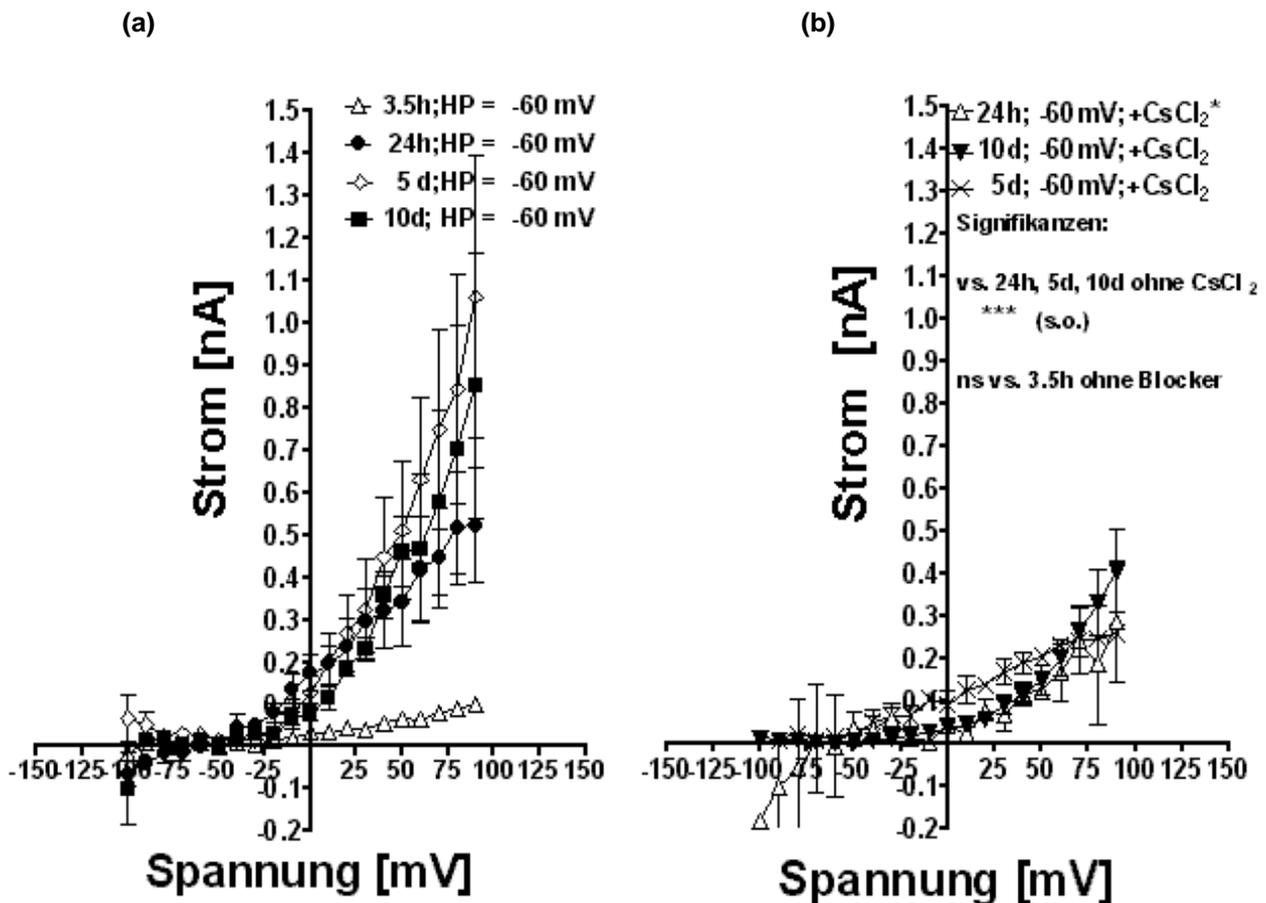


Abbildung 1.1: Charakterisierung der Makrophagen in Kultur in Abhängigkeit vom Kulturzeitraum. Whole-cell-Kaliumauswärtsströme nach Spannungssprüngen bei einem Haltepotential von -60 mV und Sprüngen nach -100 mV und bis $+100\text{ mV}$ in Schritten von 10 mV . *PC*

(a) ohne Inhibitoren im Medium

(b) 5 Minuten nach 135 mM Cäsiumchlorid

Die Auswärtsströme aktivieren ab etwa -40 mV und erreichen eine Amplitude von maximal 1.1 nA bei älteren Zellen. Hingegen sind Kaliumströme bei Zellen direkt nach Aufreinigung aus dem Gesamtblut (3.5 h , Abbildung (a)) nicht detektierbar. Die Membraneigenschaften sind weitgehend passiv und entwickeln sich erst innerhalb der ersten 24 h in Kultur. Dass diese Ströme Kalium getragen sind, belegt Abbildung (b). Nach Zugabe von 135 mM Cäsiumchlorid sind kaum noch Auswärtsströme messbar.

Die Strom-Spannungsableitungen sind alle signifikant in Abbildung (a) verschieden gegenüber 3.5h alten Zellen in Kultur und in Abbildung (b) sind alle Kurven signifikant verschieden von den Ableitungen in (a) ohne Cäsiumchlorid und nicht signifikant gegenüber 3.5h in Kultur ohne Zugabe des Kaliumkanalinhibitors CsCl₂.

Das bedeutet, dass sich bei den vorliegenden Zellen spannungsaktivierbare Kaliumströme erst innerhalb der ersten 24h in Kultur entwickeln, die dann über einen Kulturzeitraum über 10 Tage weitgehend konstant bleiben in ihrem Aktivierungsverhalten und in ihrer Amplitude, die sensitiv sind gegenüber 135mM Cäsiumdichlorid.

4.1.1.2 *immunologisch*: àCD 11c-Biotin-Streptavidin-Cytochrom-Lebendfärbung im Fluoreszenzmikroskop

(a) **CD11c-positiv markierte Humanmakrophagen [d12]**, (100X Ölimmersion im Phasenkontrast Ph1, oben und mit Fluoreszenzfilter (Cy 3), Longpass 620nm unten) muriner monoklonaler Antikörper àCD11c, 1:25-Biotin

(b) **Kontrolle: Makrophagen** behandelt ohne Antikörper aber mit Streptavidin-Cytochrom (100X, im Phasenkontrast, Ph 1, oben und mit Fluoreszenzfilter (Cy3) unten) 1: 25Biotin.

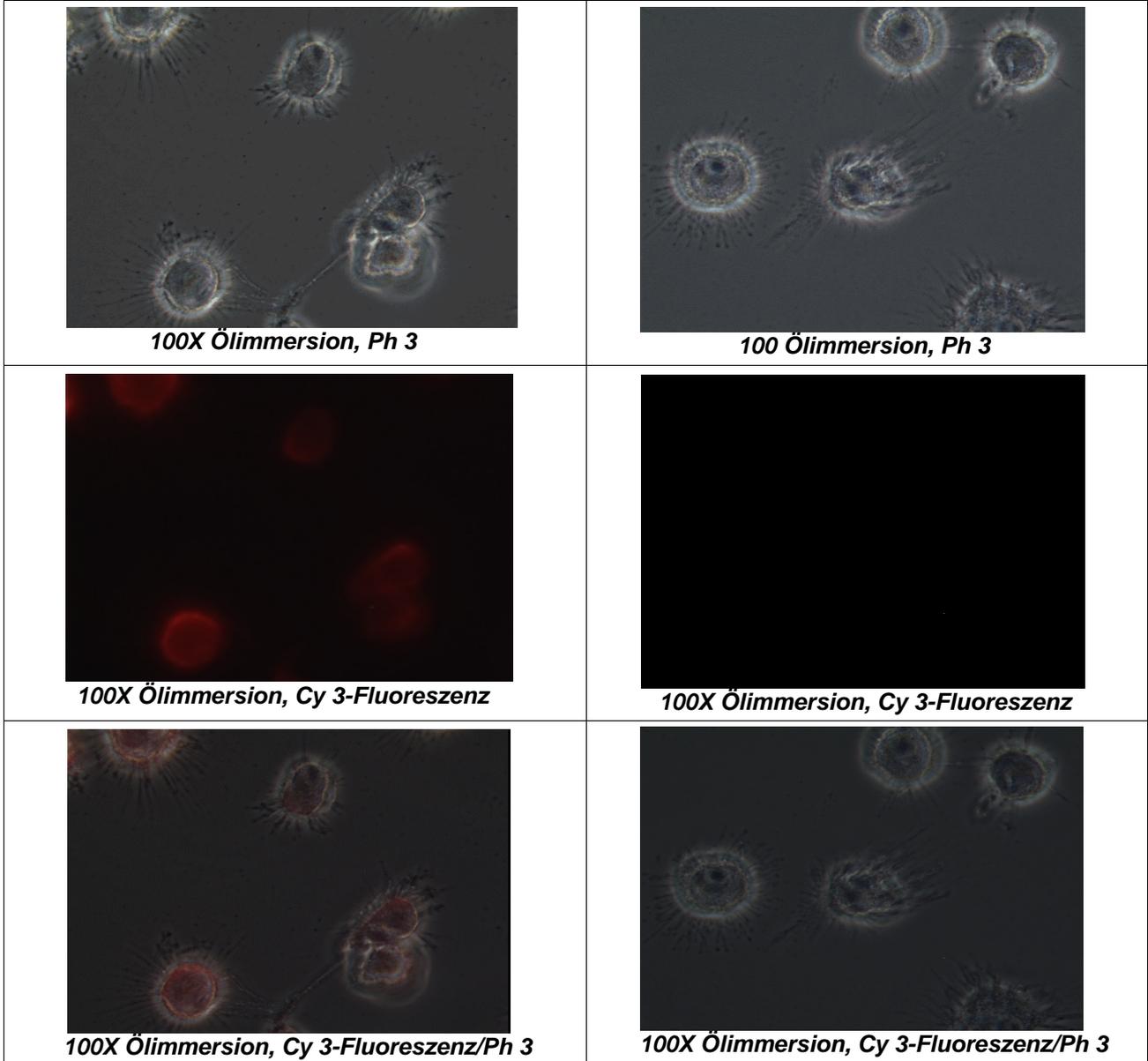


Abbildung 1.2: immunologischer Nachweis von CD11c - positiven Zellen mittels àCD11c-Biotin-Streptavidin-Cytochrom, Lebendfärbung. Die Zellen wurden 1h bei 4°C mit dem Biotin-gekoppelten Antikörper inkubiert, 2 X HBS gewaschen, 20 Minuten mit dem Fluorochrom (Streptavidin-Cytochrom, 1:100, 4°C) inkubiert, 3 Minuten HBS gewaschen, mit -20°C kaltem Aceton fixiert, 1 x Aqua dest. gespült und in Moviol eingebettet. 90.69 ± 4.7 % aller Zellen zeigen eine Positivfärbung für ein für Monozyten/ Makrophagen typisches Oberflächenantigen, CD11c (N = 185, s. Tabelle 2 nächste Seite unten). Links: Mit à CD 11c behandelte, positiv markierte Zellen, rechte Seite: Kontrolle, ohne Antikörper aber mit Fluorochrom zur Bestimmung unspezifischer Antikörper-Bindung. IF/LM

4.1.1.3 *morphologische* Charakterisierung der Zellen in Kultur nach Elektronenmikroskopie im Rasterelektronenmikroskop:

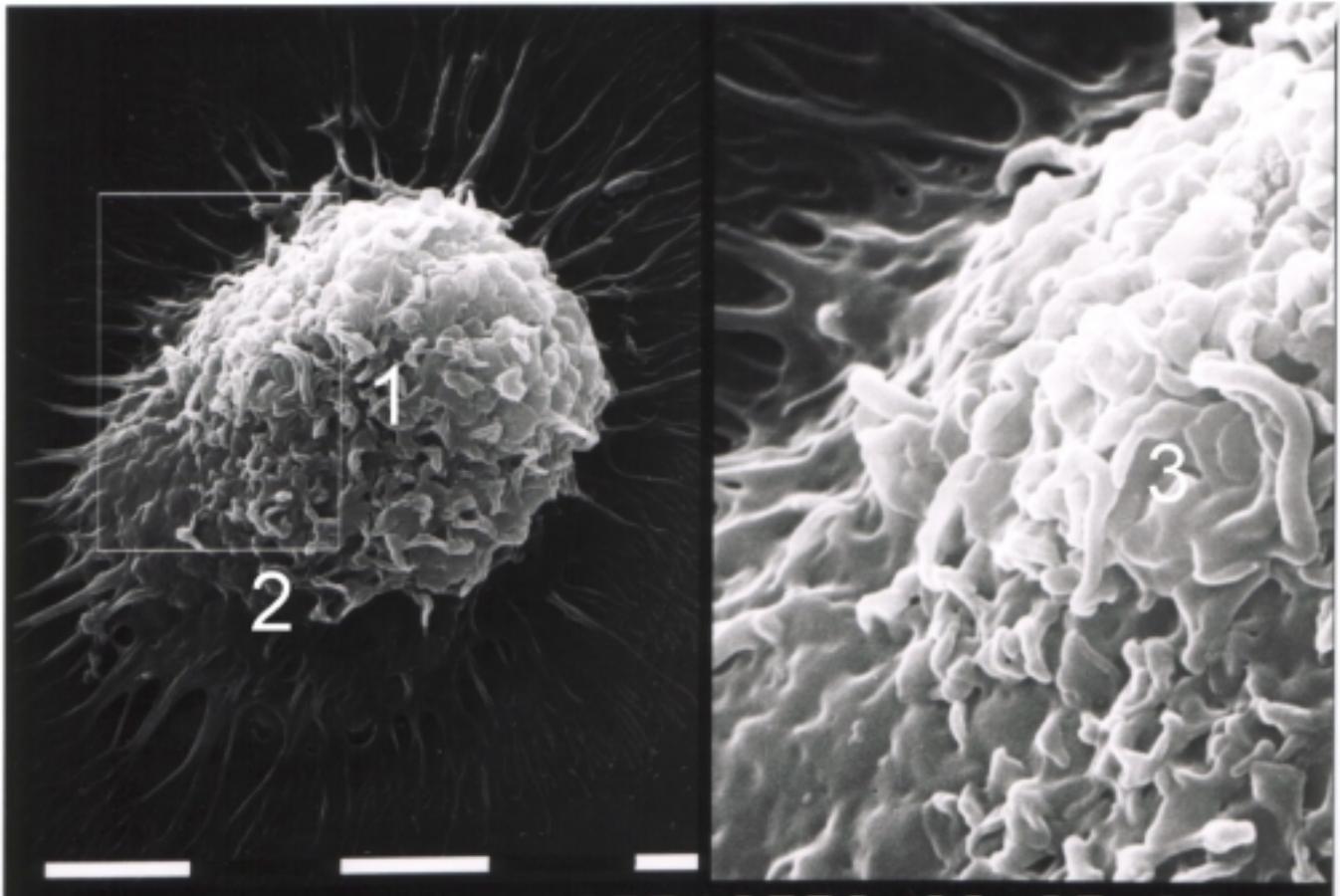


Abbildung 1.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Makrophagen (1) mit Filo-/Pseudopodien (2) und Vergrößerung der Zelloberfläche (Insertion, (3)) Vergrößerung: 4000-fach, Insertion 12500-fach, integrierter Maßstab: eine Einheit \triangleq 5 μm . EM

<i>Zellen:</i>	<i>Gesamt [Zählungen]:</i>	<i>Mittelwert \pm SEM</i>	<i>Prozent:</i>
Fluoreszenzmikroskopie (Fluoreszenzfilter 620nm, 200 X):			
Makrophagen (CD11c⁺):	185 (5)	37.0 \pm 1.92	90.69 \pm 4.7
andere:	19 (5)	3.8 \pm 0.74	9.5 \pm 1.81
Lichtmikroskopie (Phasenkontrast, Ph1, 320 X):			
Makrophagen:	433 (5)	86.6 \pm 12.4	84.4 \pm 12.1
andere:	80 (5)	16.0 \pm 2.28	15.6 \pm 2.2

Tabelle 2: Bestimmung des Anteils der in der Kultur identifizierten Makrophagen nach immunologischer Lebendfärbung und in der Fluoreszenzmikroskopie.

4.1.2 Zellvitalitätsprüfungen und Funktionstests mit ATP: Erst- und Zweitantwort:

Zur Bestimmung der Cytotoxizität von PCB 47 auf von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen wurden die Zellen für 1,5, 5 und als Endpunkt der akuten Toxizitätsprüfungen 24 h mit verschiedenen Konzentrationen PCB 47 oder mit 0.1% DMSO (DMSO-Kontrolle) behandelt.

Während nach einer Stunde bzw. 5h der Quotient zwischen Tetrazoliumsalz und gebildetem Formazan in den behandelten Ansätzen nicht signifikant verschieden ist von den Kontrollen, steigt die Toxizität bei längerer Präinkubation in allen PCB-Ansätzen und für DMSO um bis zu 80% für 100µM PCB an. Im Vergleich zu Kontrolle und kurzen Inkubationszeiten sind diese mit $p \leq 0.001$ hochsignifikant.

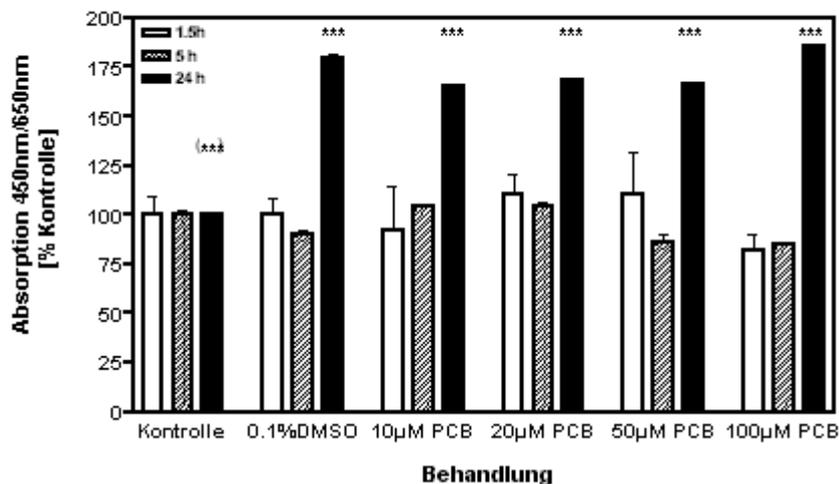


Abbildung 12: Mitochondrialer Tetrazolium-Test bei Humanmakrophagen, d 13 nach Präparation. Zellen wurden 1.5h, 5h und 24h nicht (Kontrolle), mit 0.1% DMSO oder verschiedenen PCB-Konzentrationen inkubiert, 2 h mit dem Tetrazoliumsalz inkubiert und die Bildung von Formazan durch vitale Zellen photometrisch gemessen (Dreifachbestimmungen). Der Test zeigt, dass bereits 0.1% DMSO unter den gegebenen Bedingungen über 24h bei Makrophagen toxisch sind. FIA

Bei kürzeren Inkubationszeiten bis zu 5h sind die Zellen nicht signifikant durch DMSO oder PCB geschädigt.

Um nach 24h in den linearen Absorptionsbereich (0.1 bis 0.7) für das Tetrazoliumsalz zu gelangen, mussten die Zellen 4h mit MTT inkubiert werden und ist im einseitigen Anova Test hochsignifikant verschieden von den anderen beiden Kontrollen ($p < 0.001$). Alle Messwerte behandelter Zellen wurden auf die internen Kontrollen, die auf 100% gesetzt wurden, bezogen. Innerhalb von bis zu 5 Stunden Inkubationszeit mit 100µM PCB 47 war keine Cytotoxizität feststellbar. Der verringerte Absorptionsquotient in der Kontrolle nach 24h bedeutet, dass sich nach 24h Inkubationszeit die Zahl adhärenter vitaler Zellen signifikant verringert hat, während 0.1% DMSO (und die PCB-Behandlung) zu einem Zellsterben führen, da die Absorptionswerte gegenüber der gleich 100% gesetzten Kontrolle erhöht sind, also sich der Quotient 450nm/650nm

zugunsten des nicht verstoffwechselten Tetrazoliumsalzes verschiebt.

Zur Aufklärung von Angriffspunkten des PCBs im zellulären Stoffwechsel oder an strukturellen Bestandteilen der Makrophagen wurde als Testparameter zunächst der zelluläre Calciumlevel gewählt, da fast alle Signaltransduktionswege an Veränderungen des Calciumgehaltes gebunden sind (Bhalla und Iyengar, 1999), um nachfolgend den Mechanismus näher einzugrenzen, nicht im Sinne einer dynamischen Lösung, aber als dynamischer Ansatz für eine strukturelle Lösung.

Funktionstests mit ATP: Erst- und Zweitantwort:

Die Zellfunktionalität wurde in den Calcium-Spektrofluorimetrie-Experimenten durch einmalige Gabe von 100µM Adenosin-Triphosphat getestet, die reversible Reaktion auf einen extrazellulär applizierten Agonisten, der nach dem Paradigma von zellulären Membranproteinen mit ligandengesteuerter Calciumleitfähigkeit oder solchen, die G-Protein-vermittelt zu einer intrazellulären Calciumfreisetzung aus Speichern führen. Ähnlich wie bei Zellen mit erregbaren Membranen wurde ein Parameter verwendet, der unmittelbar mit dem zellulären Calciumspiegel zusammenhängt, und der nach kurzer Applikation wieder aus der Probenkammer ausgewaschen werden kann. ATP-induzierte Calciumänderungen zeigen sich auch in patch-clamp-Experimenten (Daten nicht gezeigt).

Tote Zellen oder solche, deren Membranintegrität verletzt ist, würden auf Adenosintriphosphat nicht mit einer Änderung des zytosolischen Calciumlevels durch geringeren Gradienten reagieren können.

Makrophagen sind in der Lage, auf mehrfach hintereinander appliziertes ATP mit Calciumänderungen zu reagieren.

Dabei müssen zwischen der ersten und zweiten ATP-Gabe mindestens 40 Minuten liegen, damit die zweite Antwort (im Folgenden als Zweitantwort bezeichnet) mit gleichem Verlauf und Amplitude ausfällt, wie die nach der ersten ATP-Gabe, also äquieffektiv. Bei kürzeren Abständen ist die Zweitantwort reduziert:

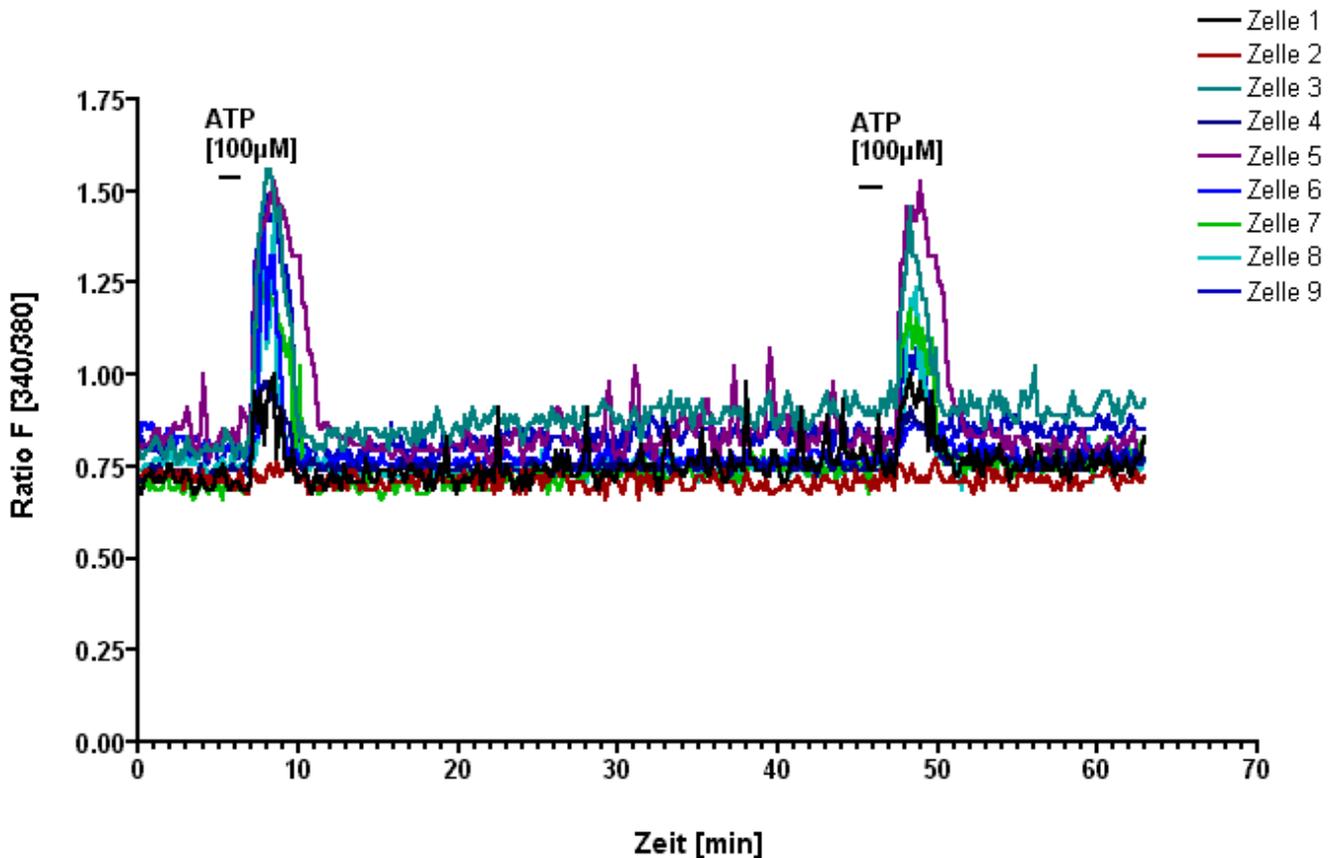
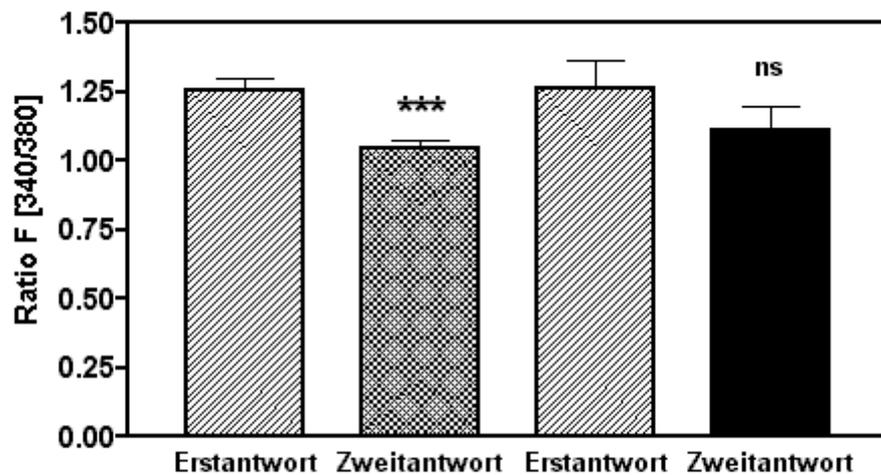


Abbildung 13a: ATP-induzierte zytosolische Calciumspiegeländerungen humaner Makrophagen in der Calcium-Spektrofluorimetrie (Originalaufnahme). Die Zellen wurden 30 Minuten mit Fura-2 beladen, mit ATP[100µM]-stimuliert, mit Natrium-HBS superfundiert und nach 40 Minuten wiederum mit [100µM] ATP stimuliert. CSF

Die Amplitude der ersten und zweiten ATP-induzierten Calciumerhöhung (im Folgenden als Erst- und Zweitantwort bezeichnet) wurden dem paired-t-test, dem strengsten statistischen Test in Bezug auf signifikante Unterschiede in gaussverteilten Parametern für voneinander unabhängige Beobachtungen unterzogen. Danach unterscheiden sich für $N \leq 20$ Zellen nach 40 Minuten die Erst- und Zweitantworten nicht voneinander.

Die Amplituden differieren nicht signifikant ($p \leq 0.5$), alle Unterschiede in den Amplituden der Erst- und Zweitantwort liegen zu 95 % zwischen -0.0091 bis 0.3225 (95 % Konfidenzintervall), der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0.69$ mit einem p-Wert von $p = 0.018$. Das bedeutet, dass ATP, 40 Minuten nach der ersten Applikation in Bezug auf Calcium-Leveländerungen einzelner Zellen das Niveau der Erstantwort erreicht.



Abstand zwischen Erst- und Zweitapplikation ATP: **10 Minuten** **40 Minuten**

Signifikanzen: $p < 0.0002$, $r = 0.587$, $p(r) = 0.0482$ $p = 0.061$, $r = 0.69$, $p(r) = 0.01$

im paired t-test, $r =$ Korrelationskoeffizient der Datenpaarung, $p(r)$...Effektivität der Paarung

Abbildung 13b: reduzierte Sekundärantwort durch zweifache ATP-Gabe innerhalb von 10 Minuten (linke Seite). Mit 40 minütigem Abstand zwischen den beiden Stimuli sind die Antworten nicht mehr signifikant unterschiedlich. Die Amplituden der Erst- und Zweitantwort wurden im paired t-Test für jede Zelle einzeln verglichen. Die in der Abbildung dargestellten Balken sind die statistische Gesamtbeschreibung der Einzelergebnisse ($N \geq 9$). CSF

Die Zelle in Spur 2 zeigt weder Erst- noch Zweitantwort auf ATP. Ausgehend von einem Parameter für Zellvitalität und ~funktionalität wurden solche Zellen im Folgenden bei unbehandelten Zellen nicht in die Auswertung einbezogen.

Bei kürzeren Abständen zwischen den beiden ATP-Stimuli fällt die Zweitantwort signifikant niedriger aus, das bedeutet, die Zellen sind nicht in gleicher Weise sensitiv für $100\mu\text{M}$ ATP, bzw. sie *desensitivieren* für ATP, ungeachtet der Tatsache, dass die Zellen über ein breites Spektrum an Purinrezeptoren verfügen.

Die reduzierte Zweitantwort bei wiederholter ATP-Applikation innerhalb von 10 Minuten bedeutet

eine Desensitivierung der Zellen im Hinblick auf die ATP-Potenz an den Rezeptoren. Erst bei einem Abstand zwischen den beiden Stimuli von ≥ 40 Minuten erreicht die Sekundärantwort wieder die Amplitude der ersten. Diese Eigenschaft bleibt über einen Zeitraum von mindestens drei Stunden messbar in der Calciumspektrofluorimetrie erhalten (Daten nicht gezeigt).

Für alle Folgeversuche wurde daher ein 40 minütiger Abstand zwischen erster und zweiter ATP-Gabe gewählt.

Zum Studium der akuten PCB-Wirkung auf Humanmakrophagen wurde in den folgenden Experimenten die Zellen nach der ATP-Erstantwort 40 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen PCB 47 (von 10 bis 100 μ M) superfundiert und nachfolgend die Zweitantwort aufgezeichnet.

Dieser Ansatz sollte einerseits spontan PCB-verursachte Änderungen des basalen Calciumgehaltes der Zellen sowie die Rezeptorfunktion der ATP-Rezeptoren erfassen.

Desweiteren wurden Zellen über einen Zeitraum von fünf Stunden mit PCB 47 [100 μ M] vorinkubiert und nachfolgend die ATP-Antworten aufgezeichnet.

Da in diesem Fall nicht die Erstantwort an unbehandelten Zellen messbar ist, wurden Konzentrations-Effektbeziehungen mit $N \geq 20$ Zellen in mindestens drei verschiedenen Ansätzen à 8 bis 10 Zellen für ATP und nach Vorbehandlung mit PCB erstellt.

4.1.3 Akut-Exposition mit polchlorierten Biphenylen (PCBs)

Wie sich in Versuchen mit Ratten-Astrozyten aus 1d alten Rattenembryonen (gleicher experimenteller Ansatz mit ATP) oder bovinen chromaffinen Zellen (mit K^+ -Depolarisierbarkeit als Vitalitätsparameter) gezeigt hat, reicht eine Inkubationszeit mit $100\mu\text{M}$ PCB 47 von 40 Minuten aus, um eine Änderung des basalen Calciumlevels zu erfassen.

Wie von Voie und Fonnum 1996 (u.a. an Mastzellen/Granulozyten), sowie in unserem Labor an Astrozyten und chromaffinen Zellen* gezeigt werden konnte, hemmen orthosubstituierte PCBs eine Calcium-Sequestrierungspumpe am endoplasmatischen Retikulum einerseits oder führen zu einer Erhöhung durch einen Einstrom über der Extrazellulärmembran*. Dies ist bei Makrophagen jedoch nicht der Fall.

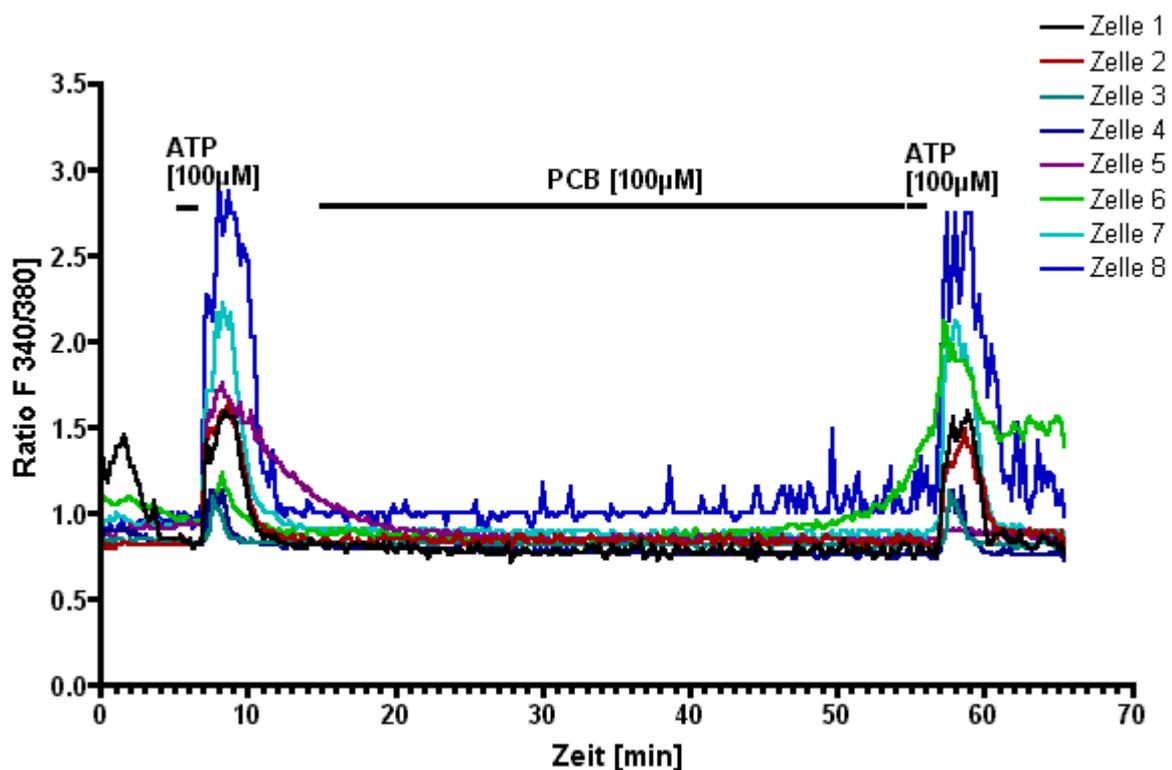


Abbildung 14: ATP [$100\mu\text{M}$] Erst- und Zweitantwort vor und nach 40 Minuten PCB 47 [$100\mu\text{M}$]. (Originalaufnahme) Im Paired t-Test ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für die Zellen vor- und nach PCB. CSF

Nach der ATP-Erstantwort wurden die Zellen 40 Minuten lang mit PCB 47 überspült und nachfolgend wurde unmittelbar die Zweitantwort gemessen.

Kriterium für den Beginn der PCB-Inkubation war das Erreichen der Basallinie nach der Erstantwort. Als Kontrollansatz wurden die Zellen desweiteren mit 0.1% DMSO, das als Lösungsvermittler für das PCB eingesetzt wurde, inkubiert (Daten nicht gezeigt).

Ausgewertet wurde nachfolgend die Amplitude der Erstantwort versus die der Zweitantwort (nach PCB) im paired t-Test für jeweils dieselbe Zelle.

Die basalen Calciumwerte ohne ATP veränderten sich während der 40 minütigen PCB-Inkubation [10 bis 100µM] nicht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 15 zusammenfassend dargestellt.

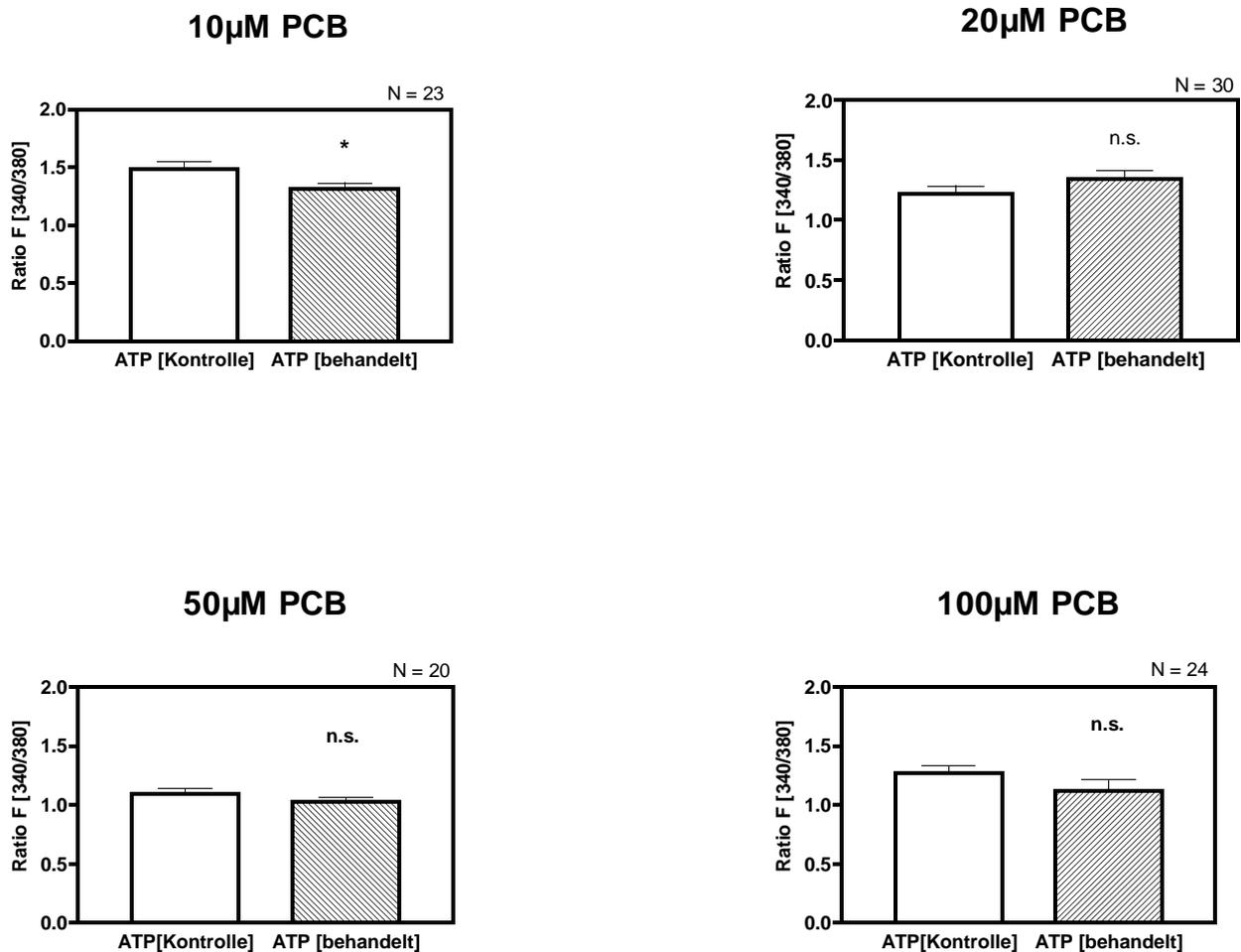


Abbildung 15: Vergleich der ATP-Erstantwort ohne und Zweitantwort nach 40 Minuten unterschiedlichen PCB 47 Konzentrationen in der Calciumspektrofluorimetrie im paired t-test. Der jeweils linke Balken im Diagramm ist die Erst- oder interne Kontrollantwort, rechts die Zweitantwort nach 40 Minuten PCB 47-Vorinkubation und [100µM] ATP. CSF

Der paired t-Test zeigt keine Unterschiede für unbehandelte Zellen (s.o.), oder für die DMSO-Kontrolle (Daten nicht gezeigt) noch für 20, 50 und 100µM PCB in den akuten Ansätzen.

Die Korrelationen der Paarung zwischen Erst- und Zweitantwort sind $r = 0.4$ (10µM PCB), 0.77 (20µM), 0.53 (50µM) und 0.5 (100µM) und für alle Ansätze mit p-Werten ≤ 0.007 hochsignifikant effektiv.

'r' bezeichnet den Pearson-Korrelationskoeffizienten und p den korrespondierenden P-Wert. Für r

positiv und $P < 0.05$ sind die Datengruppen signifikant korreliert, was den gepaarten t-Test rechtfertigt.

Das bedeutet, dass akute PCB-Inkubation über 40 Minuten bei Humanmakrophagen

(1.) weder zu einer spontanen Veränderung des basalen Calciumlevels führt, noch, dass

(2.) die ATP-Zweitantwort in Bezug auf die internen Kontrollen verändert ist, mit Ausnahme der $10\mu\text{M}$

PCB 47-Behandlung.

(3.) Ist daraus zu schließen, dass PCB 47 die purinergen Rezeptoren auf den Zellen von

extrazellulär akut mit einiger Wahrscheinlichkeit nicht modifiziert oder die ATP-Bindung

beeinträchtigt.

Da die Erstantwort in den $10\mu\text{M}$ PCB-Ansätzen im Vergleich zu allen anderen internen Kontrollantworten aber erhöht ist (s.o.), wurde dem weiter keine Bedeutung beigemessen.

Bei Mittelung der Erstantworten über alle Versuche ($N= 108$ Zellen) liegt die ATP-Erstantwort im Bereich einer Ratio von 1.25, davon ist die ATP-Antwort nach $10\mu\text{M}$ PCB nicht signifikant verschieden.

4.1.4 ATP- und Purinderivate:

4.1.4.1 Konzentrations-Effektbeziehungen

Zum Vergleich der ATP-Antworten nach 5h PCB-Vorinkubation wurden Konzentrations-Effektkurven erstellt. Dazu wurden die Zellen fünf Stunden in 1:1 HBS/Kulturmedium (DMSO-Kontrolle und PCB) vorbehandelt, da PCBs im reinem Kulturmedium nur schwer löslich sind und das Löslichkeitsprodukt schnell überschritten ist.

Zum Lösen des PCBs in Versuchspuffer wurde eine 1000-fache Lösung in reinem DMSO angesetzt (Bsp.: 100mM) und nachfolgend tropfenweise unter wiederholtem Schütteln und vortexen in HBS/Medium verdünnt.

Erstes physiologisches Anzeichen der fünfstündigen PCB-Vorbehandlung ist eine deutliche Zellschwellung, was für einen veränderten Ionenhaushalt, vorallem monovalenter Kationen spricht.

Die basalen Calciumlevel der Makrophagen sind nach 5h PCB-Inkubation unverändert.

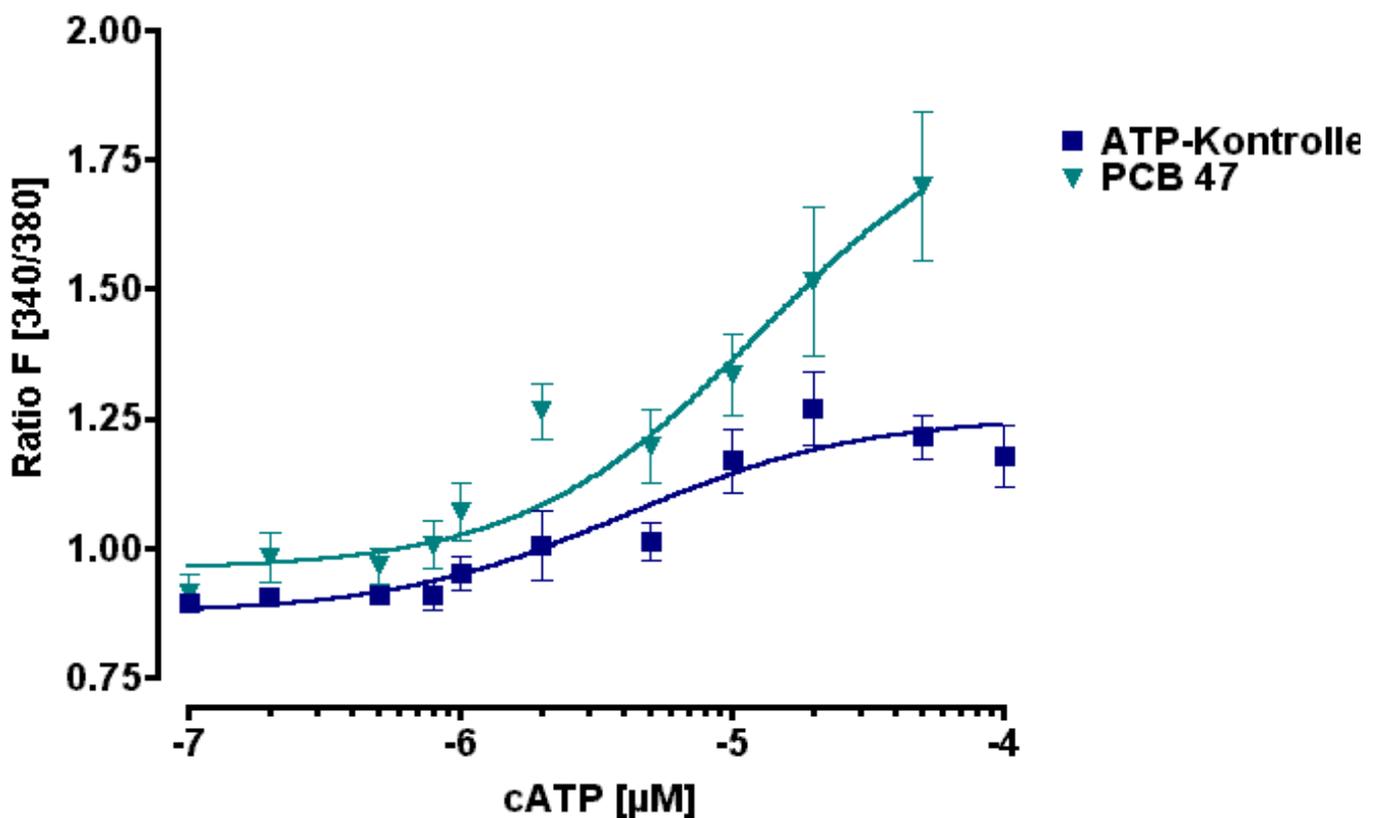


Abbildung 16a: Konzentrations-Effektbeziehungen für Kontrollen (ATP) und 5h 2,2',4,4'Tetra-chlorobiphenyl (PCB 47) [100µM] vorbehandelte Zellen. In jeweils mindestens drei verschiedenen Ansätzen und in variabler Abfolge wurden die Zellen in der Calcium-Spektrofluorimetrie in 40 minütigem Abstand mit verschiedenen Konzentrationen für 100 Sekunden mit ATP-stimuliert und die maximale Amplitude der Antworten gegen die ATP-Konzentration aufgetragen. CSF

Die [100µM]-ATP-Antwort bricht nach Vorinkubation mit 100µM PCB zusammen (nicht gezeigt). Die Kurve wurde durch die ermittelten Werte zwischen 0.1µM bis 50µM angepasst.

Die halblogarithmische Auftragung liefert eine sigmoidale Anpassung mit einem EC_{50} -Wert für die Kontrolle von $4.04 \mu\text{M}$ und für das PCB 47 von $11.3 \mu\text{M}$. Obwohl die halbmaximale Effektivkonzentration rechtsverschoben ist, steigt die Potenz des Liganden, eine zytosolische Calciumerhöhung hervorzurufen.

Der statistische Vergleich der Kurven im F-Test liefert einen F-Wert von 43.1 mit einem p-Wert < 0.05 und ist damit hochsignifikant. Da keine Anpassungsmodelle mit zwei Bindestellen für sigmoidale Anpassungen in der nicht-linearen Regression existieren, wurden die Datenpunkte in der doppeltlinearen Auftragung nach einem nichtlinearen Regressionsmodell für Eine- bzw. Zwei-Bindungsstellen angepasst. Dabei werden die Anpassungen nach einem (mathematisch) einfacherem Modell für eine Bindungsstelle mit dem komplizierteren für zwei Bindungsstellen verglichen. Eine Kurvenanpassung ist besser, sobald die Summe der Quadrate über den Standardabweichungen von der Anpassung geringer ausfällt (Motulsky, H.J., 1999).

Eine Kurvenanpassung für zwei Bindungsstellen beschreibt zwar die Lage der Datenpunkte beider Kurven besser, da die Zahl der Variablen steigt. Da die Zahl der Freiheitsgrade abnimmt und die Anpassung aber gleichzeitig negative Werte für die Dissoziationskonstante 2 (K_{D2}) liefert, wurden die maximalen zellulären Antworten nach verschiedenen ATP-Konzentrationen im linearisierten scatchard-plot aufgetragen.

4.1.4.2 Scatchard-Plot für ATP-Konzentrations-Effektbeziehung und nach 5h PCB 47-

Vorbehandlung:

Streng statistisch gilt diese Auftragung nur dann, falls für die Werte, auf deren Grundlage die maximale Anzahl Bindungsstellen, sowie Assoziations- respektive Dissoziationskonstanten berechnet werden, gleiche Varianzen gelten. Dies ist hier nicht der Fall. Zudem ist zu berücksichtigen, dass nicht an einem isolierten System gearbeitet wurde, also eine Unmenge an zellulären Modulatoren in Frage kommt (vgl. etwa Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Beeinflussung der Sauerstoffbindung am Häm). Dennoch liefert diese Auftragung wichtige Aussagen zur PCB-Wirkung bezüglich der ATP-Bindungsstellen:

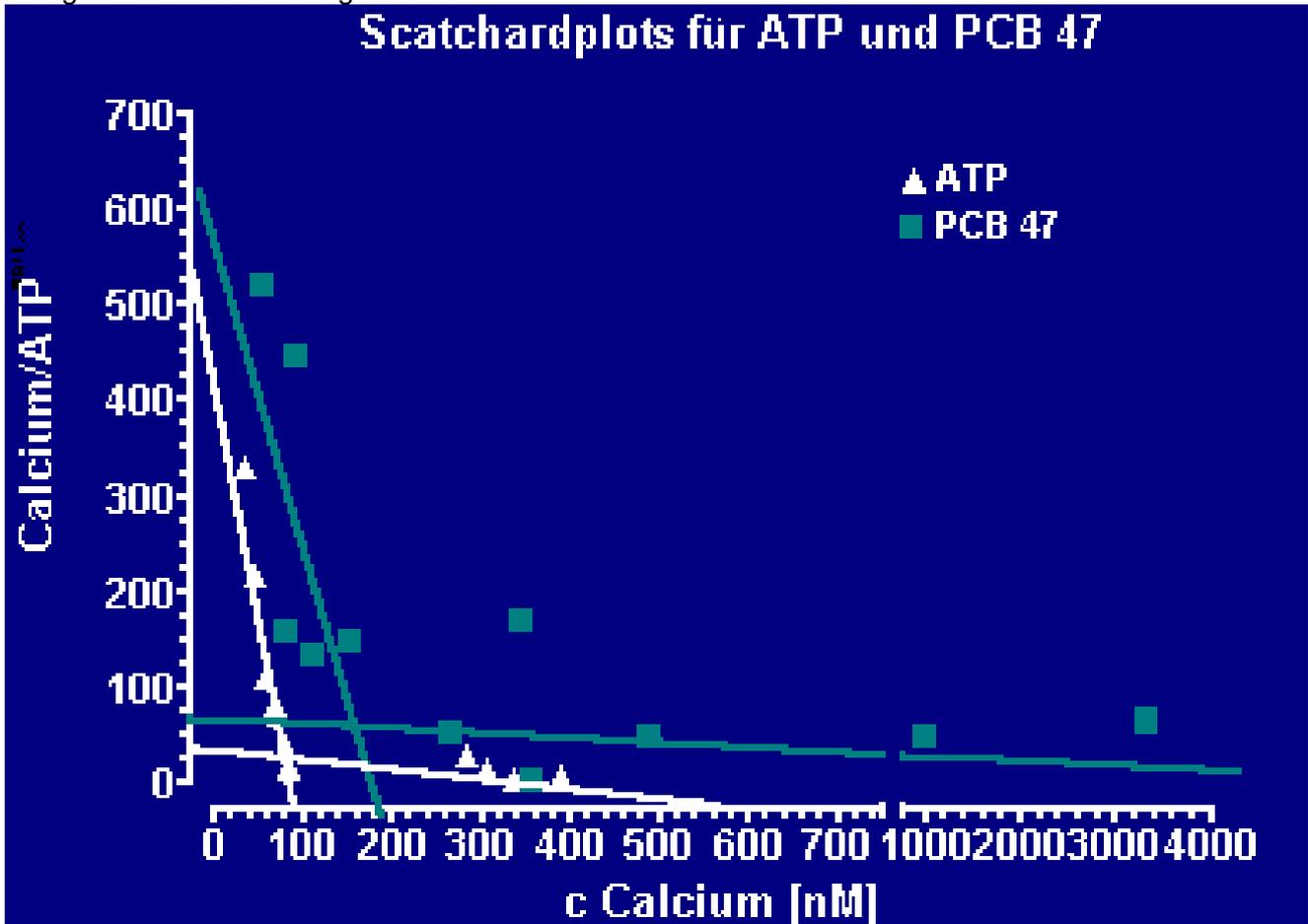


Abbildung 16b: Scatchard-plot für ATP-Kontrolle und PCB-47. Die Maximalwerte der intrazellulären Calcium-Erhöhungen nach ATP [Calcium mit der Dimension nM aus der in situ Kalibrierung, s. Methodenteil 'Calciumspektrofluorimetrie] wurden aufgetragen gegen Calcium [nM]/Konzentration ATP [μ M] und nach linearer Regression für zwei Bindungsstellen angepasst. Die Anpassung für zwei Bindungsstellen ist gerechtfertigt, da die Lage der Datenpunkte eine Assymptote an die x-Achse beschreibt und damit nicht durch eine einfache lineare Regression beschrieben werden kann.

Danach ergeben sich für die ATP-Kontrolle, wie aus der Abbildung ersichtlich wird, zwei Bindungsstellen mit unterschiedlichen Assoziationskonstanten für ATP, und zwei nach fünf Stunden

100 μ M PCB 47 Vorinkubation. Nach Arbeiten von Scatchard, Scheinberg und Armstrong (1950) ist ein scatchard-Plot für eine Gruppe gleicher und unabhängiger Bindungsstellen eine gerade Linie mit negativer Steigung. Bei einer vorhandenen zweiten Gruppe äquivalenter und voneinander untereinander unabhängiger Bindestellen aber mit geringerer Bindungskonstanten, entspricht die theoretische Anpassung einer Asymptote an die X-Achse mit den negativen K_A -Werten als Steigung der Tangenten (Edsall und Gutfreund 1978).

Die Einteilung der Daten erfolgte unter Berücksichtigung des maximal möglichen Korrelationskoeffizienten r^2 zwischen 0.6 und 0.99.

Die B_{max} -Werte als Zahl involvierter Bindungsstellen entsprechen dem x-Achsenabschnitt und sind im Kontrollansatz bei $N_1 = 523,5$ und $N_2 = 78,33$ mit zwei verschiedenen Assoziationskonstanten $K_{a1} = 6,5 \times 10^{-2}/\mu\text{M}$ und $K_{a2} = 6,65/\mu\text{M}$. Nach PCB 47 sind die B_{max} -Werte bei $N_1 = 42010$ bzw. $N_2 = 175,5$ und die Assoziationskonstanten bei $K_{a1} = 1,59 \times 10^{-3}/\mu\text{M}$ und $K_{a2} = 3,57/\mu\text{M}$. Die Dissoziationskonstanten sind mit $K_d = 1/K_a$ für die ATP-Kontrolle bei $K_{d1} = 15,4/\mu\text{M}$ und $K_{d2} = 15 \times 10^{-2}/\mu\text{M}$ und nach PCB 47-Vorbehandlung bei $K_{d1} = 628,9/\mu\text{M}$ und $K_{d2} = 12,7/\mu\text{M}$ und beschreiben den Kurvenverlauf einer hyperbolischen Anpassung für zwei Bindungsstellen nach linearer Auftragung Calcium versus Konzentration ATP besser als bei einer Auftragung Ratio versus cATP. Die Assoziationskonstanten, maximale Anzahl der Rezeptoren und die Reaktionsentropie sind in Tabelle 5 für alle erstellten Konzentrations-Effektbeziehungen in der Übersicht dargestellt.

4.1.4.3 PCB 47-Abhängigkeit der ATP-Antwort

Die Verschiebung der Konzentrations-Effektkurve ist von der PCB-Konzentration abhängig. Die EC_{50} -Werte für die Kontrolle liegen bei $4.04 \mu\text{M}$ und bei $11.3 \mu\text{M}$ für PCB-Behandlung.

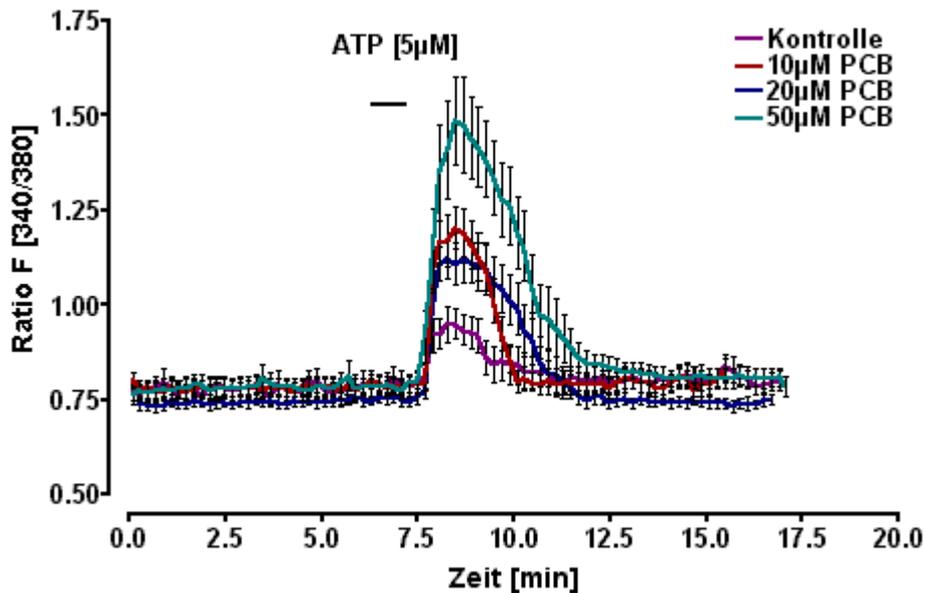


Abbildung 16c: Originalaufnahmen von intrazellulären Calciumspiegelerhöhungen nach $5 \mu\text{M}$ ATP (etwa EC_{50} -Wert) bei fünf Stunden PCB 47-Vorbehandlung mit unterschiedlichen PCB-Konzentrationen. Violette Spur unten: unbehandelte Kontrolle, darüber 10-(rot), 20-(blau) und 50 (azur) Mikromolar PCB 47, für jeweils $N \geq 9$ Zellen pro Ansatz, vier Ansätze wurden in einer Abbildung überlagert. CSF

Fünf Mikromolar ATP entsprechen somit in etwa dem EC_{50} -Wert. Um zu demonstrieren, dass die Zunahme der ATP-Potenz PCB 47-abhängig ist, wurde bei gleicher ATP-Konzentration aber variabler Konzentration der PCB-Vorbehandlung die ATP-induzierte zytosolische Calciumerhöhung aufgezeichnet. Fünf Stunden vorinkubiertes DMSO (0.1%) hat keinen Effekt auf die ATP-induzierte Calciumspiegeländerung im Vergleich zur Kontrolle (nicht gezeigt).

Ab $50 \mu\text{M}$ PCB 47 ist die Erhöhung der durch $5 \mu\text{M}$ ATP induzierten Calciumerhöhung signifikant verschieden von der Kontrolle, bei 10- und $20 \mu\text{M}$ grenzsignifikant. Eine Veränderung des Basallevels zeigt sich nicht.

Eine steigende PCB-Konzentration führt bei gleicher ATP-Konzentration im mittleren effektiven Bereich (s. Konzentrations-Effektbeziehung in Abbildung 16a) zu einer Zunahme der zytosolischen Calciumerhöhungen, was eine Konzentrations-Effekt-Beziehung für das PCB 47 impliziert.

Diese PCB-vermittelte Zunahme der ATP-induzierten Calciumerhöhung ist stereoselektiv.

4.1.4.4 Stereoselektivität der veränderten ATP-Antwort nach orthochloriertem PCB

Für die Beantwortung der Frage, ob die Beobachtung des PCB 47-verstärkten Calciumeinstroms über Purinrezeptoren auch auf koplanare PCB-Kongenerere mit gleicher Substituentenzahl zutrifft oder Stereospezifität vorliegt, wurde eine ATP-Konzentrations-Effektbeziehung nach Vorbehandlung mit [100µM] 5h PCB 77 (3,3',4,4' Tetrachlorobiphenyl) erstellt (Abbildung 17).

Von diesem koplanaren PCB-Kongener ist die Aktion über Bindung an den zytosolischen AH-Rezeptor beschrieben (Brouwer et al., Safe).

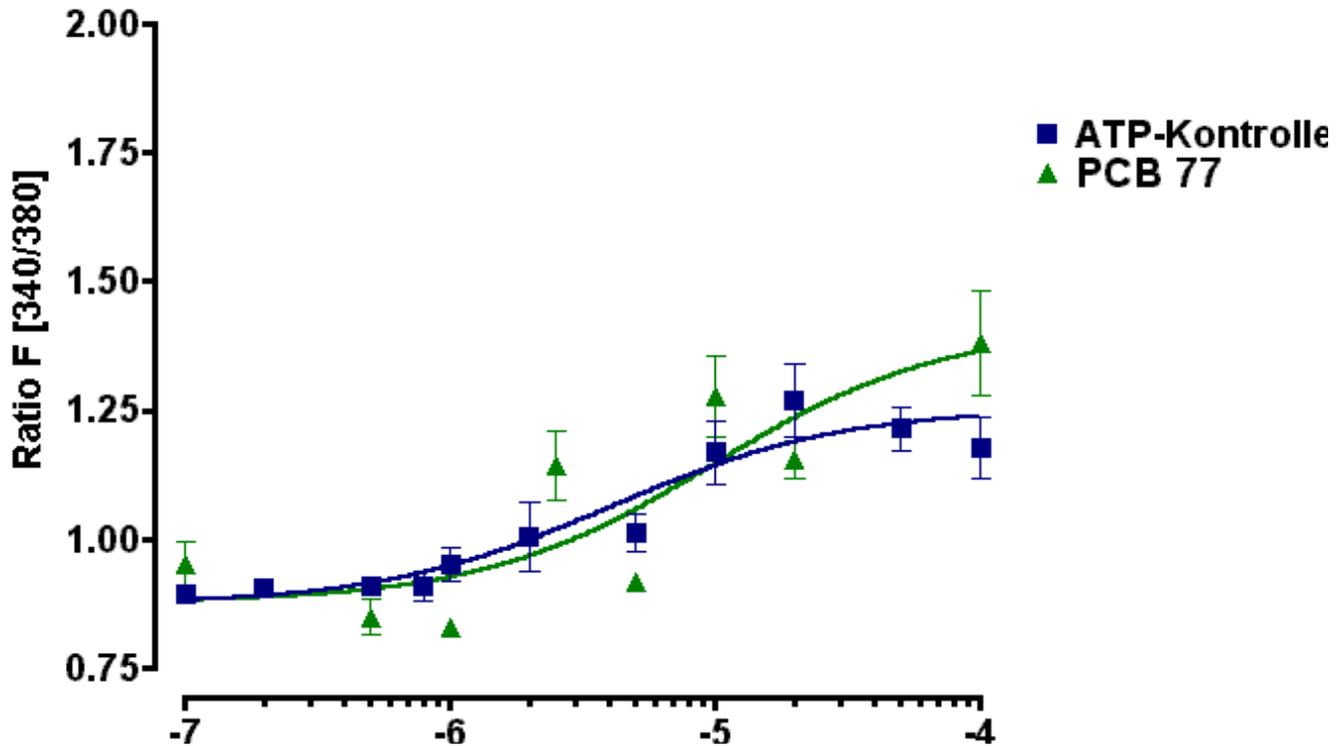


Abbildung 17: Konzentrations-Effektkurven für Kontrolle und 5h [100µM] PCB 77 (3,3',4,4'), einem nicht orthochlorierten, planaren PCB-Kongener. Die Zellen wurden nicht (Kontrolle) oder 5h mit [100µM] PCB 77 vorinkubiert, mit Fura beladen und Konzentrations-Effektkurven erstellt. CSF

Das nicht-orthochlorierte koplanare PCB 77 [3,3',4,4'] führt zu keiner signifikanten Veränderung der ATP-Konzentrations-Effektbeziehung.

Obwohl der EC₅₀-Wert bei 9,74µM liegt und diese damit im Vergleich zur Kontrolle (EC₅₀ = 4,04µM) ebenfalls verschoben ist, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den mathematisch angepassten Kurven nach dem F-Test (F = 0,07), obwohl PCB 77 den gleichen Chlorierungsgrad aufweist wie PCB 47. Das bedeutet, dass der beobachtete Effekt stereospezifisch für PCB 47 ist.

Allerdings empfiehlt die nicht-lineare Regression eine Anpassung nach einem Anpassungsmodell für eine Bindungsstelle, obschon die Anpassung für zwei Bindungsstellen besser korreliert (r² = 0,98 vs 0,95). Die Potenz des ATPs ist unverändert.

Die Suszeptibilität der Zellen für ATP nimmt nach PCB 47-Vorbehandlung also deutlich zu. Dabei sind mehrere Mechanismen denkbar:

- 1) da, wie die akut-Versuche mit 40 Minuten PCB-Inkubation belegen, die Sekundärantworten nicht verändert sind, kann davon ausgegangen werden, dass keine akute Modulation der Rezeptoren von extrazellulär vorliegt.
- 2) Daher sind entweder die purinergen Rezeptoren direkt von intrazellulärer Seite moduliert (die Rezeptorproteine selber), die modulatorischen Systeme, die die Funktionszustände der Rezeptoren bestimmen, wie Phosphatasen, Proteinkinasen, dh. die Rezeptorfunktion oder Effektorsysteme wie G-Proteine, die mittelbar bei den metabotropen ATP-Rezeptoren zur Calciumfreisetzung von intrazellulär führen, dh. die Signalkaskaden zum ER oder anderen Calcium-sequestrierenden Systemen, oder andererseits kann auch
- 3) die Zahl der Rezeptoren selber verändert sein und somit die Effektivität des ATPs auf den Zellen. Dafür spricht eine veränderte Potenz des ATPs in der Kurvenanpassung und erhöhte B_{max} -Werte ('Top' = 1.87 vs. 1.23 für die Kontrolle, vgl. Tabelle 3) für PCB 47 vorbehandelte Zellen und erhöhte Zahl der Bindungsstellen im Scatchardplot.

Um den PCB-Angriffsort zu ermitteln, wurden an den Zellen zwei verschiedene mehr- oder weniger spezifische ATP-Rezeptor-Antagonisten, XAMR und Suramin getestet.

4.1.4.5 ATP-Rezeptor-Antagonisten Suramin und XAMR

XAMR:

XAMR ist ein unspezifischer ATP-Rezeptor-Antagonist, der nicht zwischen Rezeptoren der verschiedenen Familien unterscheidet, während Suramin bei der Familie der P2Y-Rezeptoren partiell in der Lage ist, das G-Protein vom Purinorezeptor zu depletieren und somit die im sekundären Signalübertragungsprozess ausgelöste Calciumfreisetzung aus intrazellulären Kompartimenten zu unterbinden (Calbiochem, Herstellerangaben für XAMR und Suramin bzw. s. Ralevic, V. et al.).

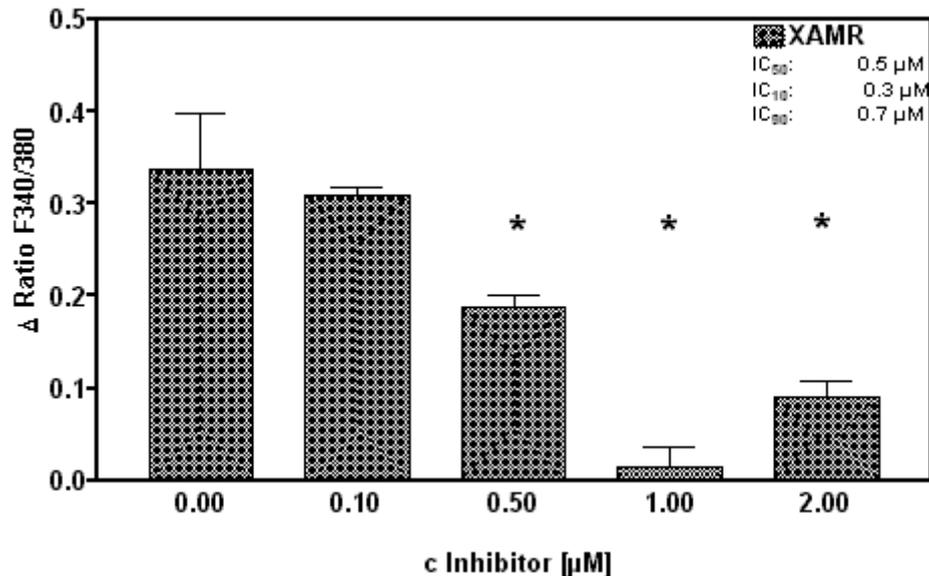


Abbildung 18: Inhibition der ATP-induzierten Sekundärantwort durch XAMR. Die Zellen wurden Fura-2 beladen, in die Anlage gebracht, die ATP-Erstantwort [100µM] aufgezeichnet, nicht (0, Kontrolle) oder mit verschiedenen XAMR-Konzentrationen inkubiert und die ATP-Zweitantworten aufgezeichnet. CSF

Für die XAMR-Dosis-Inhibitionskurve wurden die Zellen mit Fura-2 beladen, die 100µM ATP-Erstantwort gemessen, nachfolgend nach weiteren 30 Minuten HBS für 10 Minuten mit XAMR in verschiedenen Konzentrationen von 0.1 bis 2 µM inkubiert und die ATP-Zweitantwort aufgezeichnet. Aufgetragen ist die Differenz zwischen basalem Calciumlevel und der Peakamplitude als 'delta-Ratio'.

Nach einem One-way-Anova-Test wurden die ATP-Erstantworten miteinander verglichen und als nicht signifikant verschieden in den unterschiedlichen Ansätzen ermittelt.

Die Inhibitionskurve zeigt einen IC_{50} -Wert von 0.5µM, hingegen sind IC_{10} von 0.3µM und IC_{90} -Wert von 0.7µM. Abschätzungen nach einer nicht-linearen Regressionsanpassung der Daten.

Die XAMR-abhängige ATP-Dosis-Wirkungskurve ist am besten an ein Zwei-Bindungsstellen-Modell anzupassen. Das kann bedeuten, dass letztlich nicht alle betroffenen, in der Kurve integrierten Purinrezeptoren auch XAMR-sensitiv sind.

Die Kurve zeigt einen EC_{50} -Wert von $16.5 \mu\text{M}$ und ist im Unterschied zur ATP-Kontrolle mit einem F-Wert von 5.84 inhibiert. Außerdem zeigt die Kurve insgesamt eine geringere Potenz für ATP, obwohl die Maximalwerte (für $100 \mu\text{M}$ ATP) praktisch unverändert sind. Die maximale Bindung ist für die ATP-Kontrolle 1.23, für XAMR-Vorbehandlung 1.3, die ATP-induzierte zytosolische Calciomerhöhung durch XAMR antagonisierbar.

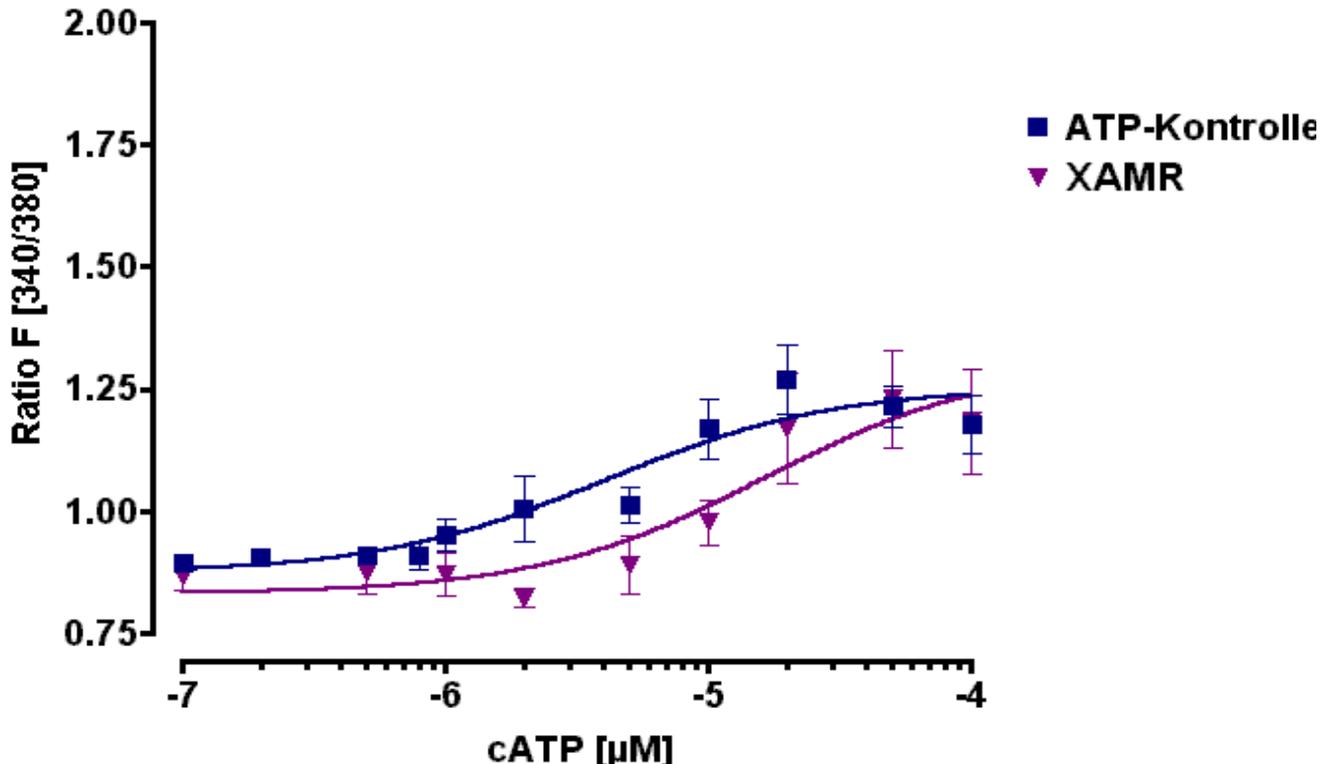


Abbildung 19a: XAMR-abhängige ATP-Konzentrations-Effekt-Beziehung. Die Zellen wurden 10 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ XAMR vorinkubiert, mit Fura beladen, und mit verschiedenen Konzentrationen ATP stimuliert. CSF

Die ATP-Konzentrations-Effektkurve ist also nach kurzer XAMR-Vorinkubation partiell inhibierbar, mit einer Rechtsverschiebung hin zu höheren EC_{50} -Werten. Die maximale ATP-Antwort nach XAMR ist aber unbeeinflusst. Das lässt auf einen kompetitiven Antagonisten schliessen.

Laut Literatur (Burnstock et al.) und Herstellerangaben (Fa. Calbiochem) ist der ATP-Rezeptor-Antagonist mit einem K_i -Wert von $19 \mu\text{M}$ in Abhängigkeit vom Zelltyp angegeben. Zumindest bei Humanmakrophagen ist der ermittelte Wert deutlich (eine 10er Potenz) darunter.

Im Unterschied zu Abbildung 18 wurden die Zellen hier vor ATP-Applikation mit XAMR behandelt. Das bedeutet, dass eine interne Kontrolle (eine ATP-Erstantwort) nicht vorhanden ist, diese aber offensichtlich Auswirkungen auf die zweite Applikation von ATP hat. Nach Abbildung 18 würde man eine nahezu komplette Inhibition der ATP-Antwort bei $100 \mu\text{M}$ nach $1 \mu\text{M}$ XAMR erwarten, was nicht der Fall ist. Hinsichtlich der Inhibierbarkeit der PCB 47-Wirkung an den purinergen Rezeptoren wurden nachfolgend die Zellen 10 Minuten mit $1 \mu\text{M}$ XAMR vorinkubiert, anschließend für fünf Stunden mit $100 \mu\text{M}$ PCB 47 und eine Konzentrations-Effektbeziehung erstellt.

Ein Großteil der Zellen zeigt nach XAMR-Inkubation in Kombination mit PCB schnelle Oszillationen des basalen Calciumlevels.

Die ermittelte Konzentrations-Effektbeziehung hat einen B_{max} -Wert (Top) von 1.28 (zum Vergleich: PCB-Vorbehandlung Top = 1.87), mit einem EC_{50} -Wert von $3.29\mu\text{M}$ und nach dem F-Test ($F = 0.59$) nicht mehr signifikant verschieden von der Kontrolle.

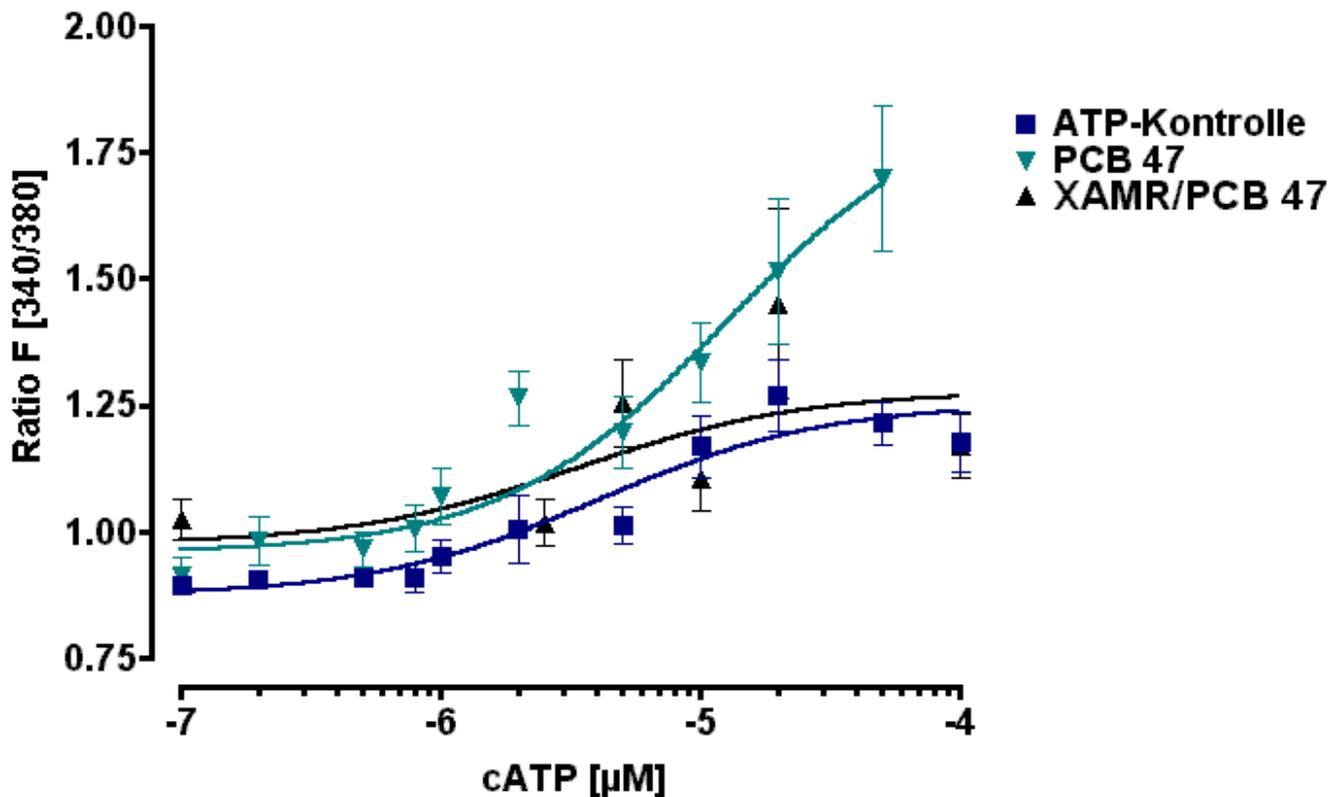


Abbildung 19b: Konzentrations-Effekt-Beziehungen für Kontrolle, 5h PCB 47 [100 μM] und 10 Minuten XAMR [1 μM]/ 5h PCB 47 [100 μM] vorbehandelte Zellen. Aufgetragen sind im doppelt-linearen Diagramm die Konzentrations-Effektbeziehungen für die Kontrolle, 5h PCB 47 [100 μM] und 10 Minuten [1 μM] XAMR/ 5h PCB 47 [100 μM] (10 min XAMR, 5 Stunden 2,2'4,4' PCB). CSF

Die Konzentrations-Effektbeziehungen nach PCB-Vorbehandlung und die Kontrollkurve sind durch ein zwei Bindungsstellen-Modell anzupassen, die XAMR/PCB-Kurve für ein Ein-Bindestellen-Modell. Das kann bedeuten, dass XAMR die ATP-Wirkung an einer Bindestelle für das PCB antagonisiert.

Als spezifischer Antagonist, der P2Y-Rezeptoren blockiert durch partielle Depletion des G_{sa} -Proteins vom Rezeptor wurde eine Inhibitions-Konzentrationskurve für Suramin erstellt. Dazu wurden die Zellen 1.5h mit Suramin vorinkubiert, mit Fura-2-AM beladen und eine ATP-Erstantwort aufgezeichnet.

Aufgetragen ist wiederum die Differenz zwischen Basallevel und der maximalen peak-Amplitude.

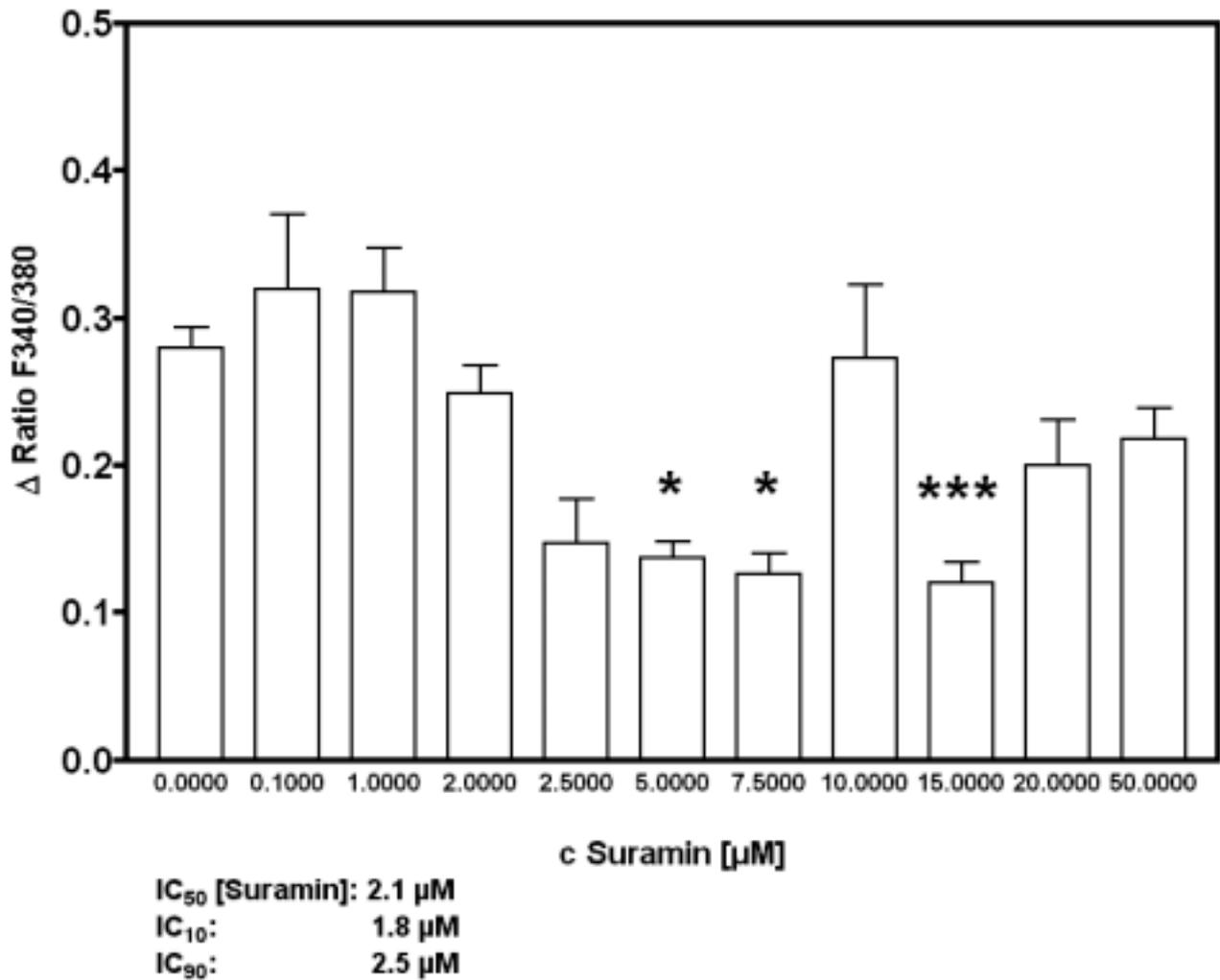


Abbildung 20: Inhibitions-Konzentrationskurve für den ATP-Rezeptorantagonisten Suramin. 1.5h mit unterschiedlichen Suraminkonzentrationen vorinkubierte Makrophagen wurden nachfolgend mit 100 μ M ATP stimuliert und die maximalen Amplituden abzüglich der Basallinie (aus den Werten 1 bis 25 der Spuren der einzelnen Zellen) Experimente errechnet wurde, subtrahiert. IC_{10} und IC_{90} -Werte aus der Abbildung sind Schätzwerte. Signifikanzen: * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.01$ CSF

Der IC_{50} -Wert von Suramin liegt bei 2.1 μ M, was sich auch mit Literaturdaten deckt (Ralevic V. et al., nach Herstellerangaben: 19 μ M, Fa. Calbiochem) mit einem IC_{10} von etwa 1.8 μ M und einem IC_{90} von 2.5 μ M.

Die basale Calcium-Linie wird durch den Inhibitor- im Gegensatz zum XAMR- nie ganz erreicht, was an sich auch den Erwartungen entspricht, da Suramin als G-Protein-Entkoppler die ligandengesteuerten ionotropen Leitfähigkeiten unbeeinträchtigt lassen sollte. Ab 10 μ M fehlt eine Inhibition teilweise oder ganz.

Die basalen Calciumwerte steigen nach Inhibitorkonzentrationen ab 10µM, es zeigt sich insgesamt außerdem eine schnelle Oszillation des Calciumspiegels in den Zellen.

Nach neueren Literaturangaben führt Suramin in Konzentrationen zwischen 0.1 und 1µM bei anderen Zellarten auch zu einer Stimulation der ATP-vermittelten Effekten an diesen Rezeptoren (Townsend-Nicholson et al, 1999).

Insgesamt waren die nach Suramin erzielten Systemeffekte nicht beschränkt auf eine Beeinflussung der ATP-Antwort allein und dort nicht eindeutig reproduzierbar. Daher wurde im Folgenden auf Verwendung dieses Inhibitors verzichtet.

Aus der Reduktion von B_{max} und einer Verringerung der Anzahl der Bindungsstellen nach XAMR in Kombination mit dem PCB 47 ergeben sich zwangsläufig die Fragen, ob *erstens* das ATP-Rezeptorsystem direkt das Target des PCBs ist, *zweitens*, ob alle auf Makrophagen beschriebenen ATP Rezeptoren gleichermaßen positiv durch PCB 47 verändert werden und *drittens*, welche Regulationsprinzipien sekundärer Art (Phospholipasen, Phosphokinasen und andere, siehe Übersicht: Kopplungssysteme von ATP-Rezeptoren, Einleitung) involviert sind.

Folgende Strategie wurde daher weiterverfolgt:

erstens: auf der Ebene der Signalübertragung und Regulation wurden verschiedene Inhibitoren regulatorischer Mechanismen auf ihre Fähigkeit hin getestet, die PCB-vermittelte Verstärkung der ATP- induzierten Calciumspiegeländerung zu reduzieren, um in erster Linie eine Aussage über die Ebene der PCB-Wirkung zu erhalten

zweitens wurden verschiedene spezifische Agonisten für Rezeptoren mit ATP-Spezifität ohne und mit PCB-Einfluss getestet und

drittens, die verschiedenen Rezeptorklassen, die eine erhöhte ATP-Suszeptibilität nach PCB zeigten, auf Gemeinsamkeiten ihrer Signalübertragungswege überprüft.

Zur Unterscheidung des Beitrages extrazellulären Calciums von dem aus intrazellulären Speichern freigesetzten wurden Calciumentzugsexperimente für Kontrollen und 5h PCB47 vorbehandelte Zellen durchgeführt. Ein extrazellulärer Calciumentzug verhindert einwärtsgerichteten Calciumfluß über der äusseren Zellmembran, und die Freisetzung aus intrazellulären Speichern kann auf diese Weise unter PCB-Einfluss recht einfach studiert werden (s. Abbildung 32 und 33), ist aber PCB-unbeeinflusst.

4.1.5 Funktion und Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase

4.1.5.1 N^ε-Amino-L-Arginin (NAA), ein Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase

Erstens: N-Acetyl-D-Arginin, ein Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase (iNOS), die ATP-unempfindliche P1_{A1}-Rezeptoren, und die metabotropen P2Y_{1,2} und 4⁻-Rezeptoren moduliert (Ralevic und Burnstock, 1998), beeinflusst die ATP-Suszeptibilität der Purinrezeptoren auf den Makrophagen in ähnlicher Weise wie das PCB.

Die Makrophagen wurden für 1,5 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des iNOS-Inhibitors NAA (N-Acetyl-D-Arginin) inkubiert, mit Fura 2 beladen und die ATP [100μM] Antwort gemessen.

Die NAA-Konzentrations-Effektbeziehung wurde also bei der als maximal effektiv getesteten ATP-Konzentration bestimmt.

Im Vergleich zur Kontrolle steigt ATP-induzierte intrazelluläre Calciumerhöhung nach NAA-Vorbehandlung in allen Ansätzen an und ist für 0.1 und 10μM nicht, für 1μM und ab 20μM hochsignifikant mit ($p < 0.001$) verschieden von der Kontrolle ($N \geq 9$).

Die Inhibition der funktionellen iNOS führt zu einem verstärkten maximalen Calciumeinstrom der Amplitude über den purinergen Rezeptoren der Makrophagen. Bei 10μM NAA liegt eine für die Rezeptorfunktion kritische Größe, bei der die konzentrationsabhängige Zunahme der ATP-induzierten Calciumleveländerung etwas reduziert ist, aber tendenziell immer noch höher als in den Kontrollen. Im einseitigen Anova-Test für Varianzen mit Tukey's Post hoc test sind 20μM NAA und 50μM nicht signifikant verschieden voneinander.

NAA-Abhängigkeit der ATP-Antwort

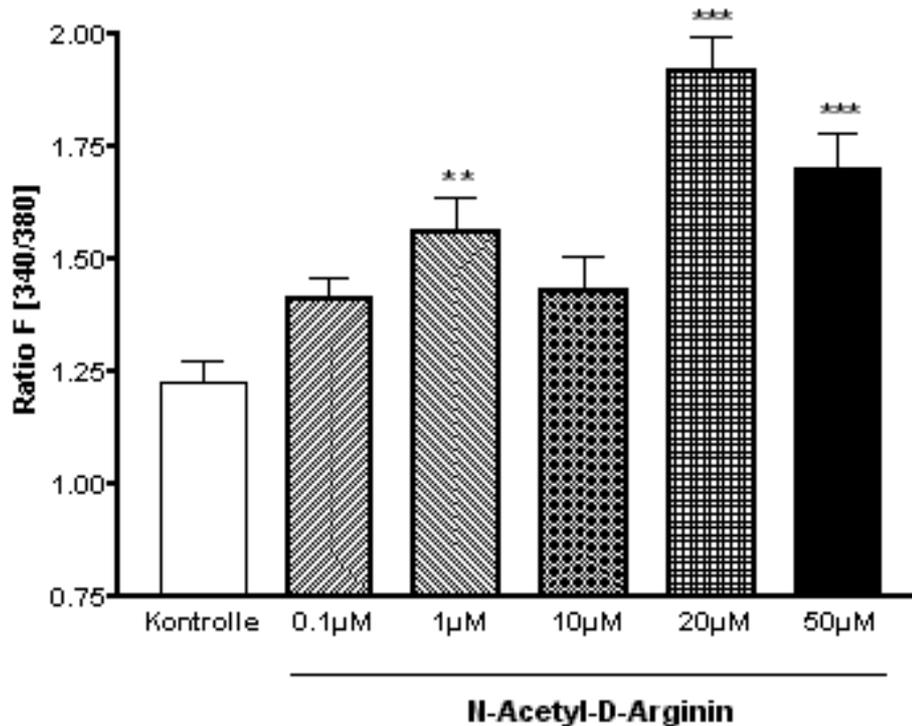


Abbildung 21a: N-Acetyl-D-Arginin-Abhängigkeit (NAA, NOS-Inhibitor) des ATP-induzierten Calciumeinstroms in Makrophagen. Die Zellen wurden jeweils nicht (Kontrolle) oder 1.5 Stunden mit den entsprechenden Konzentrationen NAA vorbehandelt, mit Fura beladen und mit 100µM ATP-stimuliert. CSF

Eine mathematische Anpassung nach nicht-linearer Regression dieser Daten für ein Ein- bzw. Zwei-Bindungsstellen-Modell liefert, obschon nur wenige Datenpunkte ermittelt wurden, eine optimale Anpassung für ein Modell mit einer Bindungsstelle. Das spricht dafür, dass die Inhibition der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase und die Rückwirkung auf die ATP-induzierten zytosolischen Calciumspiegelerhöhungen spezifisch ist. Aus der Abbildung geht nicht hervor, dass die AUC der ATP-Antworten in allen NAA-behandelten Ansätzen ebenfalls deutlich verschieden von den Kontrollen ist. Der Kurvenverlauf ist bei 0.1µM NAA flacher und langandauernder, ab 1µM NAA sind die Peaks der ATP-induzierten Antworten deutlich schärfer als in den Kontrollen, ebenso bei LPS-vorbehandelten Zellen, was außerdem impliziert, dass die Liganden-Wirkdauer, die Liganden-gesteuerten Offenzeiten der ionotropen Kanäle kürzer sind oder/und dass die ATP-abhängigen Calcium-sequestrierenden Pumpen in den Zellen durch NOS-Inhibition das Calcium schneller aus dem Cytosol entfernen (Daten nicht gezeigt), was einer Relais-Funktion der Stickstoffoxydsynthase gleichkommt.

Die NAA-Konzentrations-Effektcurve wurde im Folgenden für die subeffektive Dosis 10µM NAA erstellt.

Ähnlich wie nach PCB-Vorbehandlung allein zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Kurve mit einem EC_{50} -Wert von $5.2 \mu\text{M}$ und einem Maximalwert $Top = 1.53$, also stärkerer Potenz des ATPs an iNOS-Inhibitor vorbehandelten Zellen. Das bedeutet, gleiche ATP-Konzentrationen führen bei Inhibition der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase zu einer verstärkten zytosolischen Calciumerhöhung oder Purinrezeptorfunktion bei gleichzeitigem Verlust einer Bindungsaffinität in den Makrophagen.

Die Konzentrations-Effektkurve ist gegenüber der ATP-Kontrolle mit $F = 15.64$ hochsignifikant verschieden von der Kontrolle, in Kombination mit dem PCB 47 aber nicht mehr ($F = 0.32$, $EC_{50} = 6.72$).

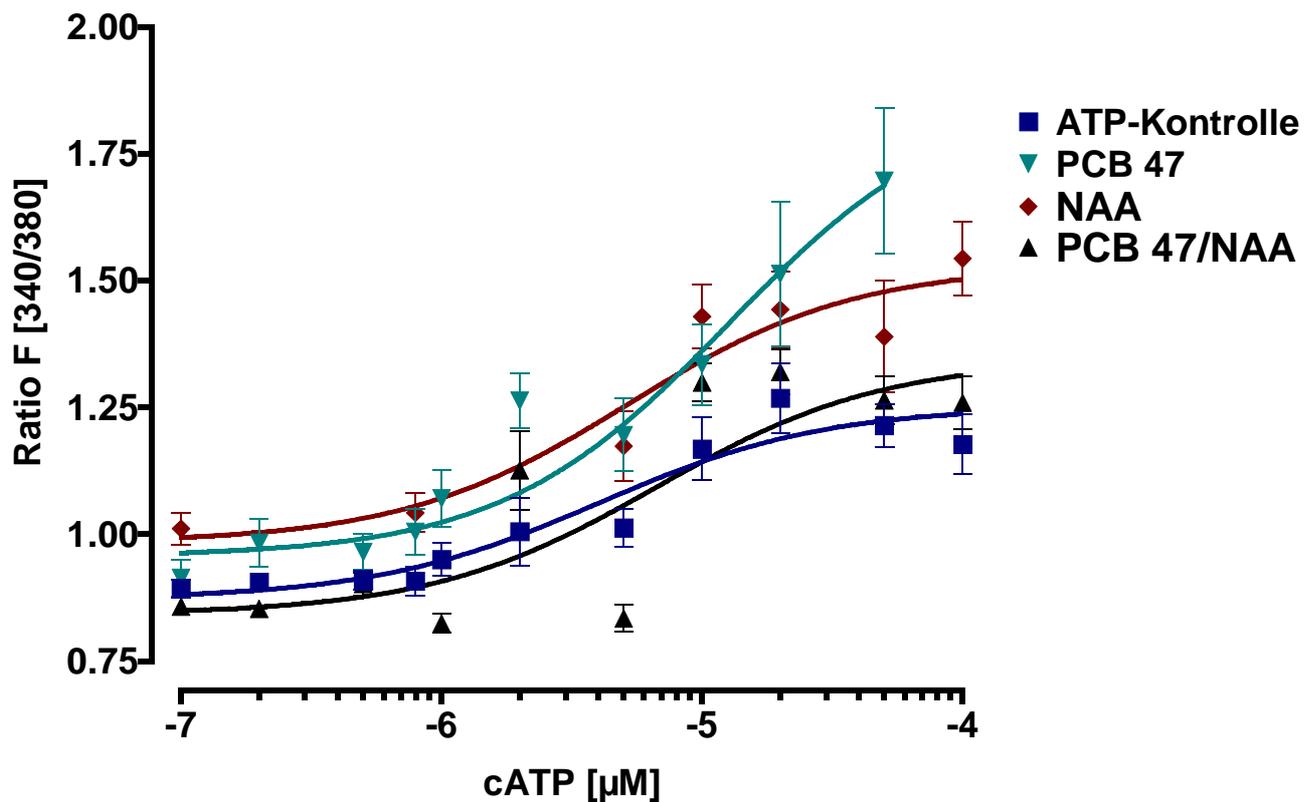


Abbildung 21b: Konzentrations-Effekt-Beziehungen für Kontrolle, 1.5h N-Acetyl-D-Arginin [$10\mu\text{M}$, 'NAA'], 5h PCB 47 [$100\mu\text{M}$] oder 5h PCB 47/1.5 h NAA ['NAA/PCB 47]-vorbehandelte Zellen. Im PCB/NAA-Ansatz wurde nach 3.5h PCB-Vorbehandlung den Kulturgefäßen NAA zugesetzt. Die Zellen wurden 30 Minuten mit Fura-2 beladen, in die Anlage verbracht und verschiedene Konzentrationen ATP appliziert. CSF

Alle abgebildeten Konzentrations-Effektbeziehungen wurden jeweils für ein- und ein zwei-Bindestellen-Modell angepasst. Die Kurven, die unter NOS-Inhibition erstellt wurden, sind am besten anzupassen durch ein 'Ein-Bindestellen-Modell. Eine verringerte NOS-Funktion in den Makrophagen führt zu einer Verringerung der ATP-Bindungsstellen.

Die Parameter aller Konzentrations-Effekt-Beziehungen sind in Tabelle 3, S. 158 zusammengestellt. In Kombination zeigen PCB 47 und der iNOS-Inhibitor, obschon man dies aufgrund der Konzentrations-Effektbeziehungen erwarten würde, keinen synergistischen Effekt in Bezug auf die ATP-induzierte Calciumspiegelerhöhung. Die Konzentrations-Effektbeziehung ist nahezu auf dem Kontroll-Level, der Verlauf entspricht einer Parallelverschiebung der NAA-Konzentrations-Effektbeziehung.

Die Betrachtung dieses Effekts gestattet die Annahme, dass der NOS-Inhibitor den PCB-Effekt kompensiert wie auch umgekehrt, das PCB den NOS-Inhibitoreffekt aufhebt. Auch ist denkbar, dass aus dem Gesamtspektrum der Purinrezeptoren auf den Zellen ein bis wenige Rezeptoren betroffen sein können.

Zunächst gestattet die hier gezeigte Konzentrations-Effektbeziehung zumindest einen Analogschluss: möglicherweise ist der PCB-Effekt ebenfalls auf eine Inhibition der Stickstoffoxydsynthese zurückzuführen, die nach Applikation beider Substanzen in den Hintergrund tritt.

Drei Punkte sind entscheidend hervorzuheben:

erstens führt der Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese zu einer Rechtsverschiebung der ATP-Konzentrations-Effekt-Beziehung ähnlich wie die durch das PCB,

zweitens besteht kein Unterschied zwischen ATP-Konzentrations-Effekt-Beziehung und der NAA/PCB-Konzentrations-Effekt-Beziehung, das bedeutet, dass auf dem Postrezeptor-Level durch eine NOS-Inhibition der PCB-Effekt auf Kontrollniveau zu bringen ist und

drittens ist die PCB/NAA-Konzentrations-Effekt-Beziehung im Vergleich zur NAA-Konzentrations-Effekt-Beziehung ebenfalls deutlich erniedrigt.

PCB und NAA zeigen keinen synergistischen Effekt, was eigentlich zu erwarten gewesen wäre.

Eine funktionelle Inhibition des NO-produzierenden Enzyms, der Stickstoffoxydsynthese, durch ein Argininderivat in den Zellen führt also zu einem verstärkten Calcium-Einstrom nach ATP.

Ob dieser Mechanismus auch der PCB-verursachten, ATP-induzierten verstärkten zytosolischen Calciumerhöhung zu Grunde liegt, sollte nachfolgend geklärt werden.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine fünf stündige PCB-Behandlung auch zu einer veränderten Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese führen kann, diese außerdem bislang noch nicht betrachtet wurde. Daher wurde nachfolgend beleuchtet, ob das PCB zu einer verstärkten Calciumerhöhung nach Aktivierung der Purinrezeptoren durch (a) eine Veränderung der Expression der Stickstoffoxydsynthese führt, und somit einer indirekten Verringerung des zytosolischen Gesamtnitritspiegels, oder (b) durch eine direkte Inhibition der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese bei den Humanmakrophagen oder (c) durch eine indirekte Inhibition der Stickstoffoxydsynthese.

Ausserdem wurde geprüft, inwieweit nach einem NO-Donor die PCB-vermittelte Rezeptorfunktionsverstärkung reversibel ist.

(d) ebenfalls ist denkbar, dass das PCB 47 mit reaktiven Nitritspezies interagiert, indem Nitrit- oder NO-Radikale vom halogenierten Biphenyl weggefangen werden. Dies kann aber nach Versuchen zur PCB-Interaktion mit den Griess-Reagentien weitgehend ausgeschlossen werden (s. Abschnitt 4.4).

Zum Studium der NOS-Expression wurde nachfolgend ein immunohistochemisches Verfahren mit einem in Kaninchen hergestellten polyclonalen iNOS-Antikörper gegen die Aminosäure-Reste 1131-1144 von Mausmakrophagen-iNOS angewendet, die auch im humanen Enzym konserviert sind.

Als Positivkontrolle für die NOS-Expression wurden die Zellen mit 10µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandfragment aus der Zellwand gram negativer Bakterien, im vorliegenden Fall *Escherichia Coli*, behandelt, das alleine oder in Kombination mit proinflammatorischen Cytokinen wie IFN- γ oder TNF- α zu einer verstärkten Enzymexpression der iNOS führt (Mohaupt et al. 1998, Beck et al 1999, Jungi et al. 1999).

4.1.5.2 Immunohistochemie:

Im Folgenden sind exemplarische Aufnahmen aus der Immunohistochemie abgebildet.

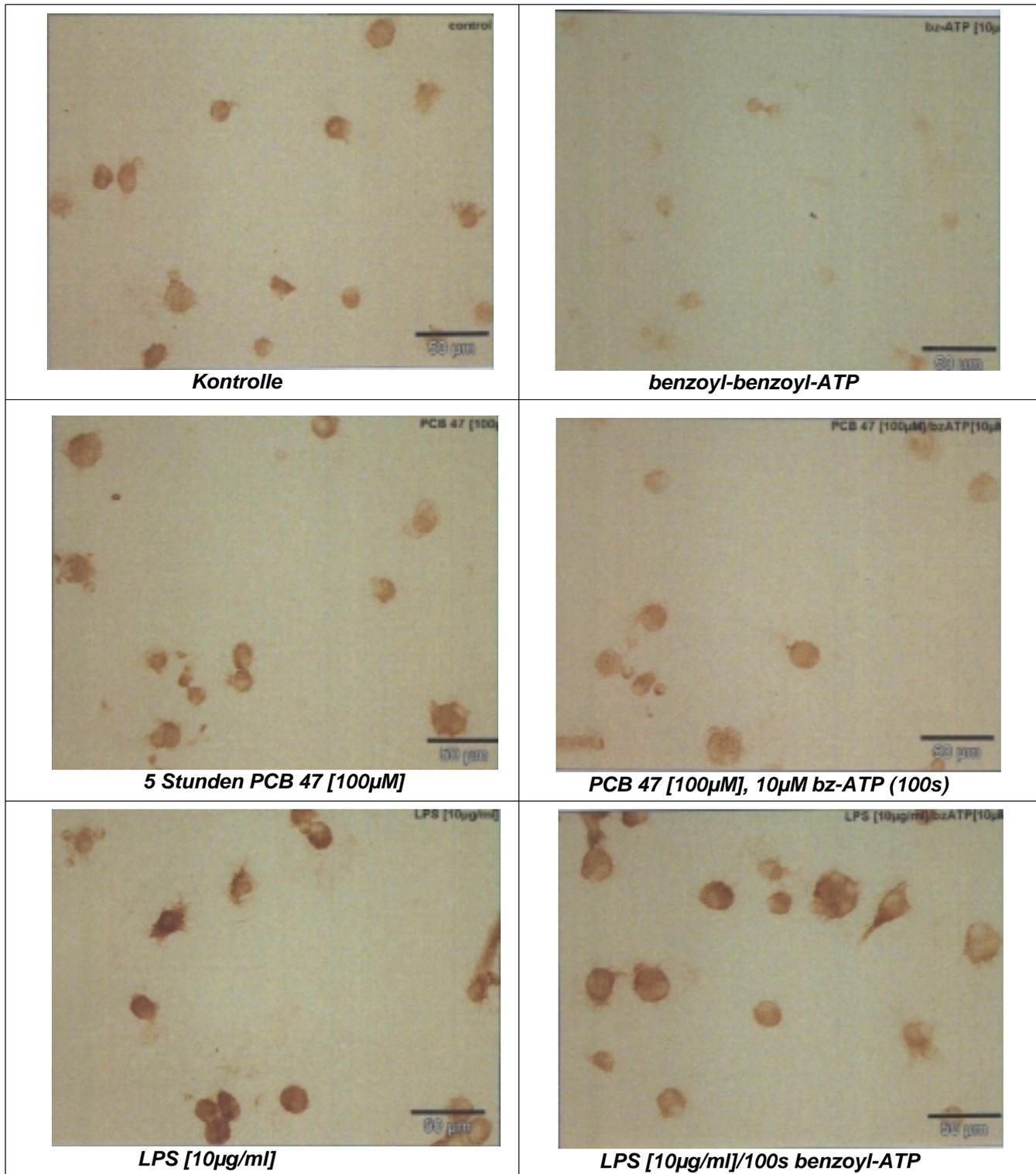


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis der iNOS-Expression. Behandlung der Zellen oben rechts, Größenangabe: 50µm. Alle Ansätze 16h nach Versuchsbeginn, Vergrößerung: 400X, Phasenkontrast. *IHC*

Zusätzlich zu Kontrolle, PCB-Behandlung und Positivkontrolle (LPS) wurden die Zellen entsprechend

der fluorimetrischen Vorversuche zur Calciummessung für 100 Sekunden mit einem ATP-Derivat behandelt, di-benzoyl-ATP, das als spezifischer Agonist für P2X₇-Rezeptoren beschrieben ist. Die quantitative Auswertung der Immunhistochemie für jeweils pro Ansatz 85 Zellen ergibt:

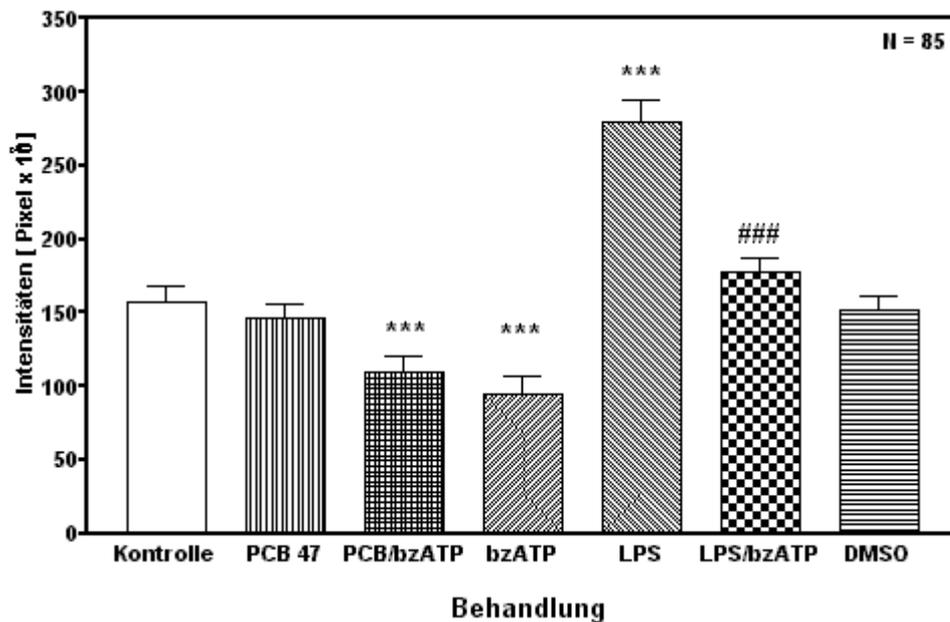


Abbildung 23: Quantitative Auswertung für jeweils 85 Zellen für die immunohistochemische Bestimmung der iNOS-Expression. Die Zellen wurden nicht (Kontrolle) oder 5h mit dem Schadstoff (PCB 47, 100µM oder 0.1%DMSO) oder 30 Minuten mit Lipopolysaccharid [10µg/ml] behandelt. Wo angegeben, wurden die Ansätze außerdem noch für 100 Sekunden dibenzoyl-ATP exponiert und anschließend nach zweimaligem Waschen mit Medium 16h im Brutschrank inkubiert. Alle Ansätze wurden 16h nach Behandlung Aceton-fixiert und über einen Meerrettich- Peroxidase- gekoppelten Antikörper immunohistochemisch angefärbt. Mit einem Bildverarbeitungsprogramm wurden die Aufnahmen digitalisiert in einen Rechner eingelesen und die Zellfärbung als relative Einheiten ('pixel') mit denselben Hintergrundwerten und Helligkeitsabgleich semiquantitativ bestimmt, da noch kein quantitatives Verfahren zur Verfügung stand. Eine dunklere Färbung bedeutet eine höhere Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase. Signifikanzen: *** = $p < 0.001$ versus Kontrolle, ** = $p < 0.01$. Nach LPS/100s [10µM] bz-ATP ('LPS/bz-ATP') ist die iNOS-Expression hochsignifikant geringer als nach LPS-Vorbehandlung alleine: ### = $p < 0.001$ versus LPS. *IHC*

Aufgetragen sind die relativen Intensitäten in Pixel/region of interest für $N \geq 85$ Zellen versus Behandlung.

Die Kontrolle ist gegenüber der intrinsichen DMSO-Kontrolle unverändert.

LPS [10µg/ml], 30 min, ist in der Lage, die iNOS spezifisch zu induzieren ($p \leq 0.001$ vs. Kontrolle), während zwischen PCB und unbehandelter Kontrolle bzw. DMSO kein signifikanter Unterschied besteht.

Die Befunde belegen eindeutig, dass das PCB 47 die NOS-Expression nicht verändert. Die Zellen

zeigen eine basale Expression des Enzyms, was nach den Befunden mit NOS-Inhibitor und PCB auch zu erwarten war.

Als ein wichtiger Nebenaspekt zeigte sich außerdem, dass die basale NOS-Induktion durch kurzfristige Applikation von 10µM benzoyl-benzoyl-ATP (100''), einem spezifischen Liganden des P2X₇-Rezeptors auf den Humanmakrophagen, drastisch reduziert wird, was bislang laut Literatur noch nicht bekannt ist.

Diese Behandlung ist auch in der Lage, bei PCB oder LPS vorbehandelten Zellen die iNOS drastisch zu reduzieren, beim PCB 47-Ansatz mit $p \leq 0.01$ gegenüber dem DMSO-Ansatz und auf den Kontrolllevel für LPS behandelte Zellen.

4.1.5.3 Inhibition der ATP-Antwort durch den NO-Donor S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin, SNAP

Alle bislang gezeigten Daten lassen auf eine Inhibition der NOS-Funktion, der Generierung reaktiver NO-Spezies schließen, zumindest als einen wesentlichen Aspekt der gesteigerten ATP-Suszeptibilität nach PCB.

Die durch den NOS-Inhibitor NAA oder durch das PCB 47 [100µM] hervorgerufene Verstärkung der ATP-Rezeptorfunktion ist durch einen NO-Donor wieder aufzuheben:

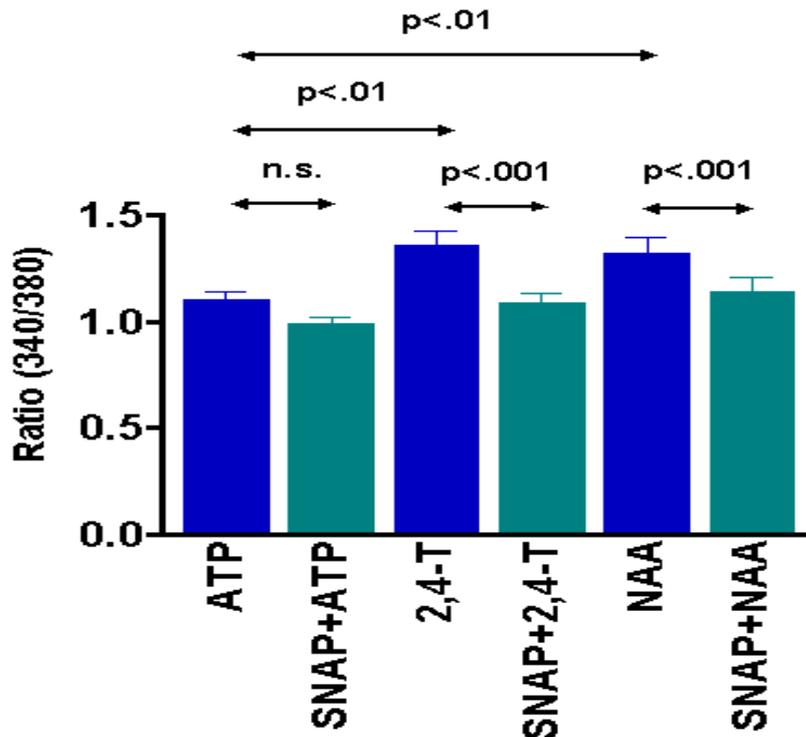


Abbildung 24: Inhibition der PCB 47 [100µM], 5h und N^G-Amino-L-Arginin [10µM], 1.5h verstärkten Calciumströme über Purinrezeptoren bei Makrophagen durch 15 Minuten [250µM] NO-Donor 'S-Nitroso-N-Penicillamin'. CSF

Dazu wurden die Zellen nicht ('Kontrolle'), 5h mit PCB 47 [100µM] ('2,4T') oder 1.5h mit NAA [10µM] ('NAA') vorinkubiert, die ATP-Erstantwort gemessen, 25 Minuten mit Na⁺-HBS überspült, 15

Minuten mit 250µM SNAP, einem Penicillinderivat, superfundiert, das als NO-Donor fungiert, und die ATP-Sekundärantwort gemessen.

Dabei zeigt sich, dass SNAP in der Lage ist, durch NO-Donation die NAA bzw. PCB-induzierte Zunahme der ATP-Antwort wieder auf Kontrollniveau zu bringen. Das bedeutet, dass sowohl PCB- als auch NAA- verursachte Rezeptorfunktionsänderungen auf eine *funktionelle* Inhibition der iNOS in Humanmakrophagen zurückgehen.

Um diese Beobachtung zu untermauern, wurde der NO-Gehalt in den Makrophagenkulturen mittels colorimetrischem Assay, der auf der Griess-Reaktion beruht, nach PCB-Vorbehandlung bestimmt.

Da einerseits das Kulturmedium (RPMI 1640 Basismedium, wie praktisch alle gängigen kommerziellen Kulturmedien) bereits hohe Mengen NO enthält, wurde die Expression der Stickstoffoxydsynthase, um detektierbare Unterschiede sichtbar zu machen, in den Makrophagen zunächst 16h mit 10µg/ml Lipopolysaccharid induziert.

4.1.5.4 Gesamtnitrit-Freisetzung bei 16 Stunden 10µg/ml LPS induzierten Zellen nach 5 Stunden

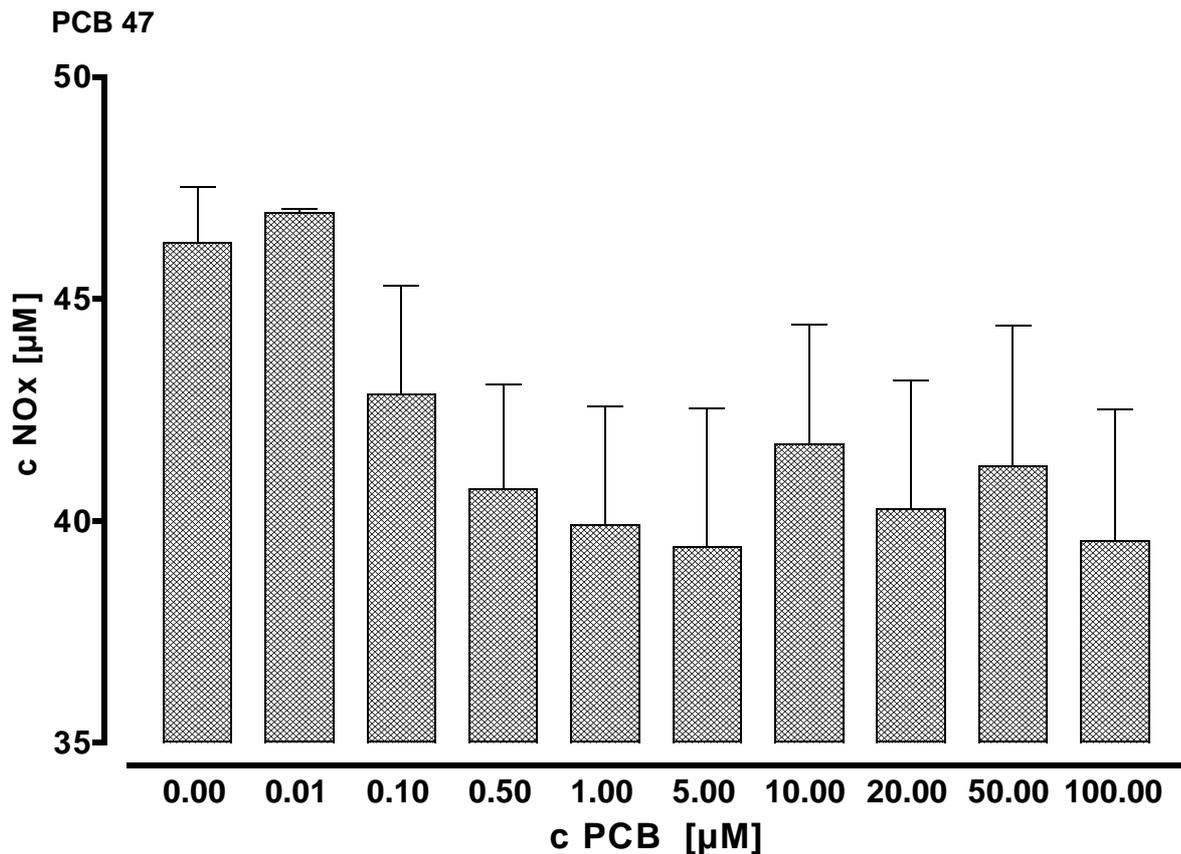


Abbildung 25: Gesamtnitritfreisetzung in 16 Stunden [10µg/ml] LPS induzierten und 5h in HBS/Medium oder 5h mit unterschiedlichen PCB 47-Konzentrationen vorbehandelten Makrophagen. Werte aus einem typischen Assay mit Dreifachbestimmungen. *FIA*

Die Abbildung 25 zeigt die Gesamtnitrit-Messungen aus einem Gesamtnitrit-Assay bei 16 h 10µg/ml LPS vorinkubierten Humanmakrophagen. Nach 16h NOS-Induktion wurden die Überstände verworfen und die Zellen für fünf Stunden 1:1 v/v in Na⁺-HBS/Medium ohne (LPS 5h, interne Kontrollen) und mit PCB gehalten (PCB-Ansätze).

Das in den Ansätzen enthaltene Nitrat wurde zunächst in einer Nitratreduktase-Reaktion zu Nitrit umgesetzt und das überschüssige NADPH durch eine Kopplungsreaktion durch die Lactatdehydrogenase (LDH) zu NADP⁺ oxidiert, da NADPH die Griessreaktion stört.

Die Gesamt-NO-Verringerung in den Ansätzen durch PCB ist im post-Test mit $p < 0.001$ für linearen Trend hochsignifikant.

Das PCB inhibiert bei fünf Stunden Inkubation also die funktionelle induzierbare Stickstoffoxydsynthase.

Die Verschiebung der ATP-Konzentrations-Effektkurve ist, wie mit dem spezifischen NOS-Inhibitor gezeigt werden konnte, teilweise auf eine Verringerung der NO-Produktion in den Zellen zurückzuführen, die die Rezeptoren empfindlicher für den Liganden, Adenosintriphosphat, macht (Abbildung 10).

Die Standardabweichungen in den Ansätzen sind, wie für die 100nM PCB-Werte angedeutet, verhältnismäßig groß, die absoluten Gesamtnitritwerte verlaufen aber in den Ansätzen (mit jeweils Dreifachbestimmungen) parallel.

Weder die unterschiedliche Anpassung an mathematische Modelle noch die verschiedenen EC_{50} -, K_D - und B_{max} -Werte sind aber allein dadurch zu erklären.

Ob das PCB tatsächlich direkt die funktionelle NO-Synthase inhibiert, oder das das Arginin- oder NADPH-generierende Enzymsystem, und ob verschiedene ATP-Rezeptoren betroffen sind kann an dieser Stelle nicht erschöpfend beantwortet werden, würde aber zumindest das 'Zwei-Bindungsstellen-Anpassungsmodell' nach 10 μ M N-Acetyl-D-Arginin/ 100 μ M PCB 47 für die Konzentrations-Effektkurve erklären.

Im vorliegenden Ansatz liegen, was zu bedenken ist, modifizierte Versuchsbedingungen vor, denn die Zellen waren 16h mit 10 μ g/ml Lipopolysaccharid-vorbehandelt.

4.1.6 Agonistenscreening für veränderte Liganden-Potenz nach PCB 47 an spezifischen Purinrezeptoren

4.1.6.1 spezifische Agonisten: $\alpha\beta$ -me-ATP, 2',3'-o-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP, Uridindiphosphat (UDP) und Uridintriphosphat (UTP): Kontrollen

In der Folge sollte durch spezifische Agonisten der verschiedenen Purinrezeptoren einerseits und spezifische Antagonisten zellulärer Signalübertragungswege andererseits die für die PCB-Wirkung suszeptiblen Rezeptoren identifiziert werden. Denn, wie aus den Konzentrations-Effekt-Beziehungen für PCB 47 und PCB 47 in Kombination mit XAMR im Vergleich zur Kontrolle hervorgeht und aus der Scatchard-Analyse deutlich wird, ändert sich nach PCB-Behandlung die Zahl der Bindungsstellen für ATP auf den Zellen.

Folgende Strategie wurde verfolgt:

Soweit für bestimmte, auf Humanmakrophagen beschriebene, ATP-sensitive Purinrezeptoren spezifische Agonisten bekannt sind, wurden diese auf ihre Fähigkeit hin überprüft, bei den Zellen eine zytosolische Calciumerhöhung hervorzurufen und durch schnelle Applikation der Derivate zu gewährleisten, dass die entsprechenden Rezeptoren durch Desensitivierung, die ebenfalls überprüft wurde, von anschließend applizierten Liganden nicht mehr angesprochen werden.

Dieselben Ansätze wurden nachfolgend nach PCB 47-Präinkubation durchgeführt, um den oder diejenigen Purinorezeptoren zu finden, die im Vergleich zur Kontrolle eine nach PCB-Vorbehandlung erhöhte zytosolische Calcium-Veränderung nach Agonistenapplikation aufweisen.

Ziel dieser Studien war es, (1) nachfolgend die PCB-sensitiven Rezeptoren auf bisher beschriebene, bekannte gemeinsame Regulationsprinzipien zu überprüfen und (2) deren Sensitivitätsmechanismus für das PCB mittels Inhibitoren zu charakterisieren um somit (3) das mögliche Target für die durch PCB 47 gesteigerte Suszeptibilität gegenüber ATP zu ermitteln.

Agonistenscreening: Kontrolle

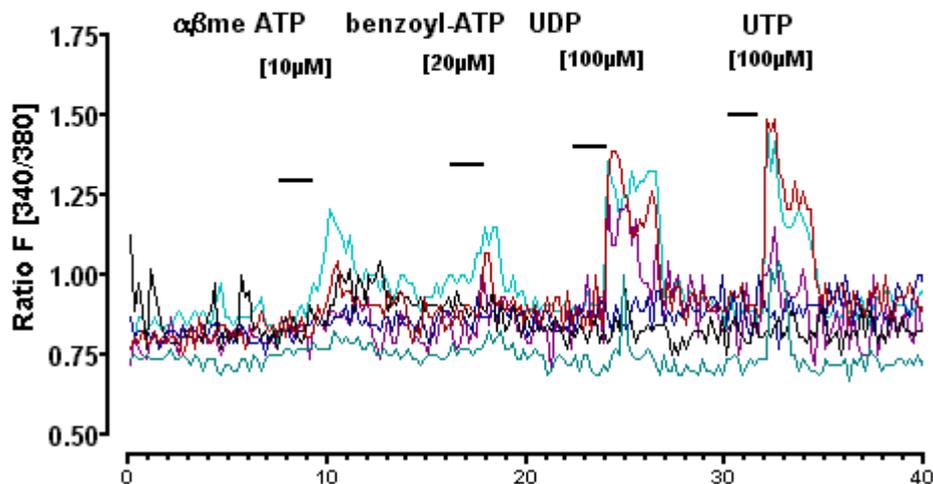


Abbildung 26a : Durch verschiedene Agonisten hervorgerufene Calciumspiegeländerungen bei Humanmakrophagen. Die Zellen wurden 30 Minuten mit Fura-2 beladen und für 100 Sekunden mit den Agonisten für P2X₁/X₃-Rezeptoren ($\alpha\beta$ -Methyl-ATP), P2X₇-Rezeptoren (benzoyl-benzoyl-ATP), P2Y₄/Y₆ Rezeptoren (UDP) und P2Y₂/Y₄/Y₆ (UTP) superfundiert. CSF

Die Agonisten wurden in der oben genannten Reihenfolge in jeweils achtminütigem Abstand appliziert, der zu kurz ist, um beispielsweise für zwei aufeinanderfolgende ATP-Applikationen gleichhohe Calciumantworten hervorzurufen.

Die benzoyl-benzoyl-ATP-Konzentration mit 20 μM wurde gewählt, da in der Literatur dieser Agonist als 10 bis 100x potenter an diesen Rezeptoren als ATP beschrieben ist. Faktisch entspricht diese Konzentration in etwa dem EC₃₀-Wert der Konzentrations-Effektbeziehung. Das $\alpha\beta$ -Methyl-ATP konnte aufgrund seiner schweren Löslichkeit in DMSO nicht höher konzentriert appliziert werden. Für UDP und UTP wurden 100 μM gewählt, da bei verschiedenen Zellarten Maximaleffekt-ATP-Konzentrationen mit 100 bis 300 μM angegeben werden (King et al., 1998, Naumov et al., I und II, 1995) und UDP- bzw. UTP- empfindliche Rezeptoren eine Subpopulation darstellen. Komplette Konzentrations-Effektbeziehungen für diese Agonisten wurden nicht erstellt.

Versuche zur Rezeptordesensitivierung belegen, dass $\alpha\beta$ -Methyl-ATP und dibenzoyl-ATP innerhalb eines Zeitraumes von drei Stunden bei wiederholter Applikation keine zweite Calciumerhöhung auszulösen vermögen, die Zellen also für diese Agonisten desensitivieren. Für UDP und UTP gilt dies allerdings nicht in solch strengem Maße. Wiederholte Agonistenapplikation führt innerhalb der angegebenen Abstände zu einer Desensitivierung von 30 bis 40 % gegenüber der ersten hervorgerufenen Calciumspiegeländerung (s. Tabelle 4, S. 98, Desensitivierungs-versuche).

Abbildung 26a zeigt die durch Applikation der genannten Agonisten hervorgerufenen zytosolischen Calciumerhöhungen. $\alpha\beta$ -me-ATP ist spezifischer Agonist für P2X₁- und X₃-

Rezeptoren, der in einer Konzentration von 10µM zu einer Calciumerhöhung bis zu einer durchschnittlichen Ratio von etwa 1.0 führt. Das gleiche gilt für 2', 3'-(4-O-benzoyl-benzoyl)-ATP, einem spezifischen Agonisten für den P2X₇-Rezeptor. Uridin-Diphosphat, ein Agonist für metabotrope P2Y₄ und P2Y₆ -Rezeptoren und UTP, ein Agonist für vornehmlich P2Y₂ (aber auch P2Y₄) führen, nacheinander appliziert, zu einer zytosolischen Erhöhung des Calciumspiegels mit einer Ratio von etwa 1.2.

UDP wurde vor UTP appliziert, um nach Möglichkeit P2Y₂, für die UTP spezifisch ist, von P2Y₄/Y₆-Rezeptoren zu unterscheiden, die sowohl UDP als auch UTP binden, mit einer Spezifität UTP>>UDP (Alexander, S., MacKenzie, G., 2000).

Da keine spezifischen Agonisten für P2Y₁ -, P2X₂ -, X₄-, X₅- und X₆ - Rezeptoren vorhanden sind, wurden diese nicht überprüft.

Die verschiedenen Rezeptoren haben teilweise dieselben Kopplungssysteme in der zellulären Signaltransduktion (s. Abbildung 6 Purinorezeptoren, Einleitung).

4.1.6.2 5h PCB 47- Vorbehandlung

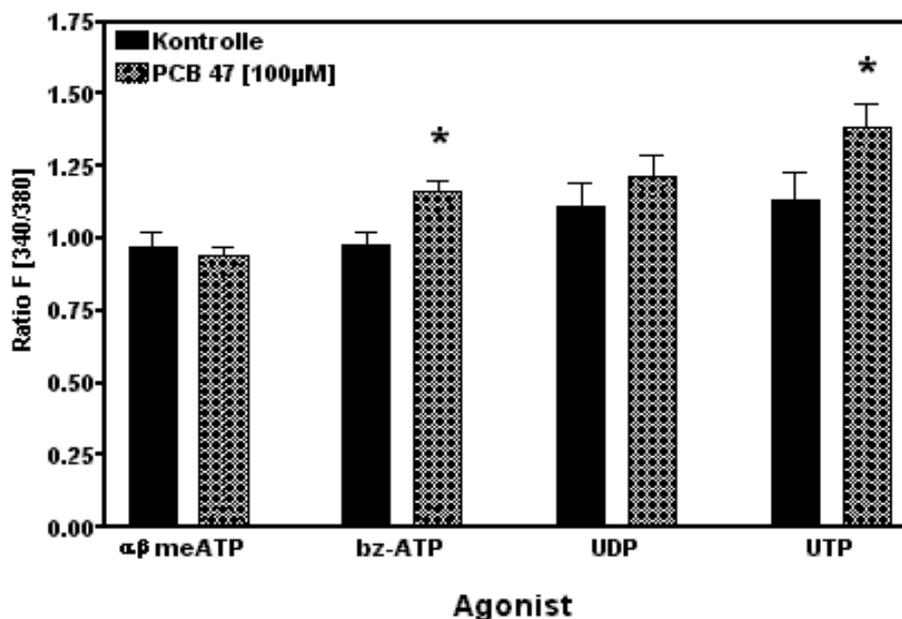


Abbildung 26b: Vergleich der maximalen zytosolischen Calciumerhöhungen bei verschiedenen Agonisten für ATP-Rezeptoren in Kontrollen und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Zellen. Signifikant erhöhte Rezeptorantworten zeigen sich beim Agonisten für P2X₇-Rezeptor und UTP, einem Agonisten für P2Y₂- und Y₄-Rezeptoren.

Nach 5h PCB 47-Vorinkubation sind die Agonisten-vermittelten Calciumspiegelerhöhungen nach Dibenzoyl-ATP und UTP signifikant erhöht, also bei Agonisten für den P2X₇-Rezeptor (Dibenzoyl-ATP) und dem für P2Y₂ - und Y₄- Rezeptoren (UTP). Alle anderen Agonisten führen zur gleichen zytosolischen Calciumerhöhung wie in den Kontrollen.

Da bereits gezeigt wurde, dass das PCB 47 einerseits bei akuter Applikation die Purinrezeptoren von extrazellulär unbeeinflusst läßt und durch die Experimente zur Stickstoffoxydsynthase-Funktion und Expression veränderte Agonisten-Potenz bei veränderten Gesamtnitritspiegeln zu beobachten ist, wurden nachfolgend verschiedene Modulatoren und Inhibitoren rezeptorassoziierter Sekundärsysteme auf ihre Fähigkeit hin getestet, den PCB 47-Effekt zu verändern.

Die hier gezeigten Experimente sollen belegen, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen die PCB-Aktionen bei den Humanmakrophagen lediglich auf zwei der zu testenden Rezeptorfamilien fokussiert sind.

4.1.7 P2X₇-Antagonist und Calcium-Calmodulinkinase-Inhibitor KN-62 nach PCB 47-Inkubation

Der Effekt des in niedrigen Konzentrationen P2X₇-Antagonisten (bis 100nM) und in hohen Konzentrationen Calciumcalmodulinkinaseinhibitors (bis 10µM) KN-62 wurde zunächst auf die ATP-evozierte Sekundärantwort in Konzentrationen von 10nM bis 2µM getestet, vergleichbar dem Versuchsablauf in den Abbildungen 13 a, 13b und 14. Bei 30 Minuten Einwirkzeit hat KN-62 auf die ATP-evozierte Calciumerhöhungen keinen Einfluss (nicht gezeigt).

Dreissigminütige KN-62-Inkubation und anschliessende Aufzeichnung der Agonisten evozierten zytosolischen Calciumspiegeländerungen für αβ-me-ATP und nachfolgend benzoyl-benzoyl-ATP blockiert selektiv die durch benzoyl-benzoyl-ATP hervorgerufen Calciumspiegeländerungen ab 100nM KN-62 bis 1µM. Bei Konzentrationen darüber ist zusätzlich der basale Calciumlevel in den Zellen deutlich *verringert* (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 27 sind die peak-Antworten für die verschiedenen Agonisten nach 30 Minuten KN-62 [10nM], einem P2X₇-Rezeptor-und Calcium-Calmodulin-Kinase II-Inhibitor, dessen Wirkort sich nach Herstellerangaben an der Calciumcalmodulin-Bindungsstelle befindet, dargestellt. Die Zellen wurden entweder nicht [Kontrolle], 30 Minuten mit 10nM KN-62 [10nM KN-62], 5h [100µM] PCB 47 [PCB 47] oder mit 5h PCB 47/ 30 Minuten [10nM] KN-62 [PCB 47/KN-62] inkubiert, mit Fura beladen und die Rezeptorantworten auf die verschiedenen Agonisten gemessen.

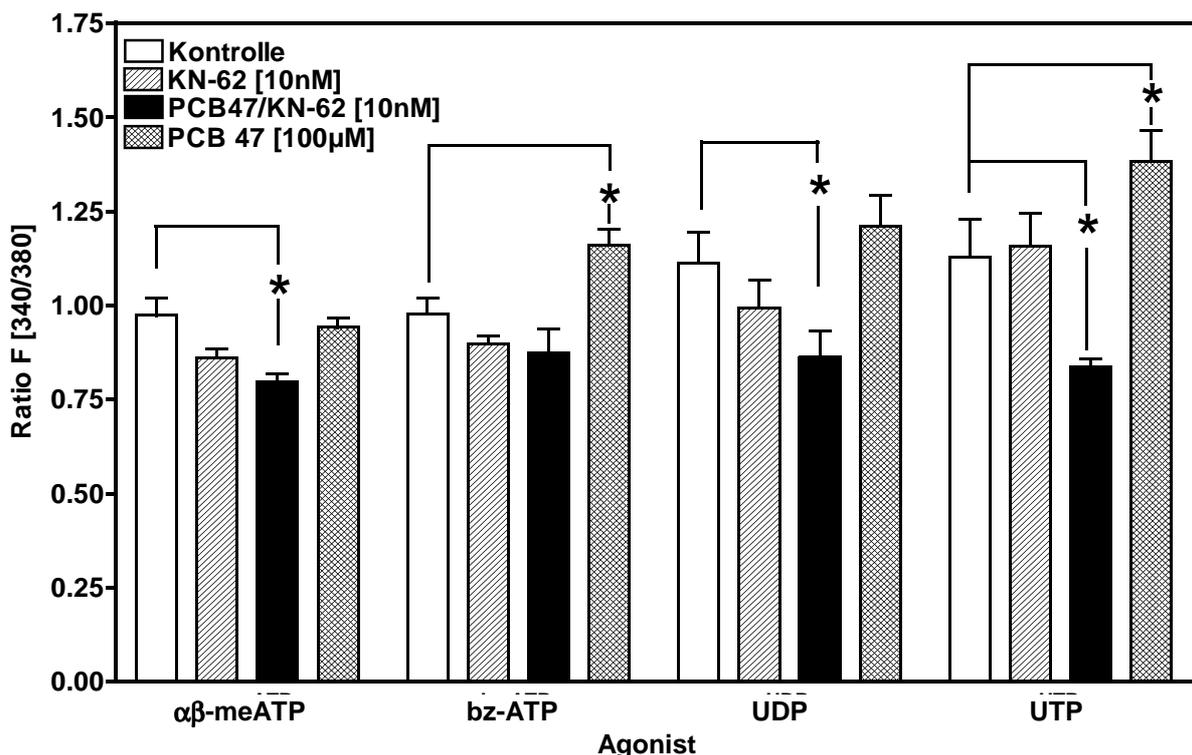


Abbildung 27: maximale Antworten nach den verschiedenen Agonisten für Kontrolle ['Kontrolle'], 5h PCB 47 [100µM], ['PCB 47'], der P2X₇-Antagonist KN-62 ['KN-62'] und PCB 47 in Verbindung mit dem Calcium-Calmodulinkinase- und P2X₇- Rezeptor-Antagonisten KN-62 ['PCB 47/KN-62']. CSF

PCB 47sensitive Rezeptoren, die durch die-Behandlung eine erhöhte Suszeptibilität aufzeigen,

sind der P2X₇- Rezeptor und die UTP-sensitiven P2Y₂ und P2Y₄ -Rezeptoren. Abbildung 27 zeigt eine signifikant erhöhte Suszeptibilität der Purinorezeptoren bei P2X₇ und bei der UTP-Antwort nach PCB 47 ('PCB 47'), die beide durch KN-62 blockierbar sind ('PCB 47/KN62').

Inkubation nur mit dem P2X₇-Rezeptoren-Antagonisten ('KN-62') führt bei keinem Agonisten zu einer signifikant veränderten zytosolischen Calciumerhöhung nach Applikation im Vergleich zur Kontrolle.

Mindestens für den P2X₇-Rezeptor bedeutet das, dass das PCB 47 intrazellulär nach der Rezeptorebene agiert.

Das Calciumcalmodulin/Calciumcalmodulinkinase-System kann ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation des zytosolischen Calciumspiegels spielen, vorallem im Zusammenhang mit rezeptorvermittelten Prozessen (s.a. Einleitung: CA1-Region NMDA-Rezeptoren im Hippocampus der Ratte). Es ist nicht auszuschliessen, dass die hier gezeigten Effekte Calciumcalmodulinkinase abhängig sind, obwohl die verwendete KN 62-Konzentration niedriger ist als im Rattenhirn beschrieben (Schnabel et al., 1999)

In der gezeigten Abbildung führt KN-62 bei 10nM zu einer Inhibition der PCB-Antwort über den P2X₇-Rezeptor auf den Kontrollelevel.

Die Calcium-Calmodulinkinase, die verschiedene Proteinphosphatasen triggert, scheint wesentlicher Bestandteil der funktionellen Purinrezeptoren (P2Y_{UDP}, P2Y_{UTP}) zu sein. Vorallem für die UDP- und UTP- abhängigen Rezeptoren ist nach KN-62 keine Änderung der Antworten im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten, das heisst, die Rezeptoren sind selber nicht sensitiv für KN-62. Das gilt aber nicht für den P2X₇-Rezeptor, dessen Antwort durch KN-62 spezifisch blockierbar ist.

In Verbindung mit dem PCB sind die verstärkten Antworten beim P2X₇-Rezeptor auf Kontrollniveau, beim UDP- und UTP-Rezeptor aber signifikant drastisch reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Falls das PCB die CaCAMK inhibierte, wäre ein synergistischer Effekt mit KN-62 zu beobachten. Würde die Calciumcalmodulinkinase vom PCB stimuliert, wäre eine Reduktion des PCB-Effektes an allen betroffenen Rezeptoren zu erwarten.

Das Calciumcalmodulin aber erfüllt, wie aus der Einleitung deutlich wird, auch regulatorische Funktionen der Phospholipasen (über Membrancycler wie MARCKS), der Stickstoffoxydsynthase (Dimerisierung) und der Regulation zytosolischer Nukleotidspiegel (cAMP/cGMP) über das Phosphodiesterase I-System (Essayan, D.M, 1999 und Gantner, F. I et al., 1997).

Daraus kann man folgende Schlüsse ziehen:

(1) Primär nicht PCB-empfindliche Rezeptoren sind:

P2X₁ und X₃-Rezeptoren, die keine Veränderung in ihrer Calcium-Antwort zeigen, obschon diese bei 10µM αβ-methyl-ATP gering ausfällt.

(2) Als mögliche Target-Rezeptoren für das PCB kommen somit folgende Systeme in Frage: P2X₇

und P2Y_{UTP} (d.h. P2Y₂, Y₄, Y₆) -Rezeptoren.

- (3) Da die PCB-Effekte spezifisch durch den P2X₇-Rezeptoren-Antagonisten und Calcium-Calmodulinkinase-Inhibitor zu blockieren sind, ist der PCB-Effekt auf eine Beeinflussung eines in Bezug zur Calcium-Calmodulinkinase stehenden Signalübertragungsweges zurückzuführen.

Auf der Ebene der Calcium-Calmodulinkinase konvergieren Calcium-abhängige Signalübertragungsmechanismen einerseits und Wege der Signalweiterleitung über den intrazellulären Botenstoff cAMP.

Nach 5h PCB 47 [100µM] und 30 Minuten [10nM] KN-62 ist die evozierte Antwort signifikant verringert gegenüber der Kontrolle neben dem P2X₁/X₃-Rezeptorsystem bei den P2Y_{4/6} (UDP), P2Y₂-Rezeptor-vermittelten zytosolischen Calciumerhöhungen. Das sind auch die Rezeptorklassen die durch das PCB 47 signifikant positiv beeinflusst werden.

Wie sich in den Calciumentzugsexperimenten zeigen wird, ist die Calciumerhöhung von intrazellulär (und auch die Entfernung des Calciums aus dem Zytosol) nach PCB-Vorinkubation unverändert.

Der P2Y₆-Rezeptor ist -im Gegensatz zu den UTP-spezifischen P2Y_{2/4} und dem IBMX-sensitiven P1A₁- Rezeptor – laut Literatur (Ralevic/Burnstock) nicht durch die Stickstoffoxydsynthese reguliert.

Ob nach spezifischem NOS-Inhibitor verschiedene spezifische Rezeptoren nach Agonistenapplikation dysreguliert sind, wurde aber nicht überprüft.

Die Funktionen der Calcium-Calmodulinkinase hängen einerseits ab von der Bindung des Calcium-Calmodulins, das selber Calcium-abhängig aktiviert, und von der Aktivierung durch cAMP.

Zu klären bleibt eine mögliche Stimulation des Calcium-Calmodulins durch PCB - etwa durch einen PKC-abhängigen Prozess - oder eine durch das PCB veränderte Membrangängigkeit des KN-62.

4.1.8 hohe zytosolische Level an zyklischen Nukleotiden:

Die zytosolischen Spiegel an zyklischen Nukleotiden werden physiologisch durch Phosphodiesterasen kontrolliert. Von den im Wesentlichen in zwei Formen existierenden Phosphodiesterasen sind in Makrophagen die Phosphodiesterase I, die Phosphodiesterase III (beide cAMP-abhängig), sowie die Phosphodiesterase IV (cGMP-abhängig) beschrieben (Essayan, D.M., 1999, Gantner et al. I bis III, 1997 und 1999). Die cGMP-abhängigen PDE koppeln an die Stickstoffoxydsynthase, deren reaktive NO-Spezies in Neuronen die präsynaptische Guanylatzyklase triggern, sowie die Phosphokinasen und die PKC.

Experimentell werden durch 8-bromo-Derivate der PDE-Substrate, 8-br-cGMP und 8-br-cAMP, die beide resistenter gegenüber der Hydrolyse durch die entsprechenden PDEs sind, die zytosolischen cGMP- bzw. cAMP-Spiegel angehoben. cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinasen verbleiben in ihrem aktiven Zustand, was zu zahlreichen Proteinphosphorylierungsprozessen und entsprechenden zellulären Antworten führt.

4.1.8.1 cAMP-Agonist 8-bromo-cAMP:

Zunächst wurden die Zellen 5h mit dem PCB inkubiert, nachfolgend für 15 Minuten mit 20µM 8-br-cAMP ('PCB/8-bromo-cAMP') und anschliessend die Agonisten in dergleichen Reihenfolge wie oben beschrieben appliziert. Als Kontrollversuche wurden unbehandelte Zellen ('Kontrolle'), nur PCB ('PCB 47') oder nur 8-br-cAMP ('8-bromo-cAMP') präinkubierte Zellen mitgeführt. Abbildung 28 zeigt die Peakantworten nach den Agonisten in den verschiedenen Ansätzen.

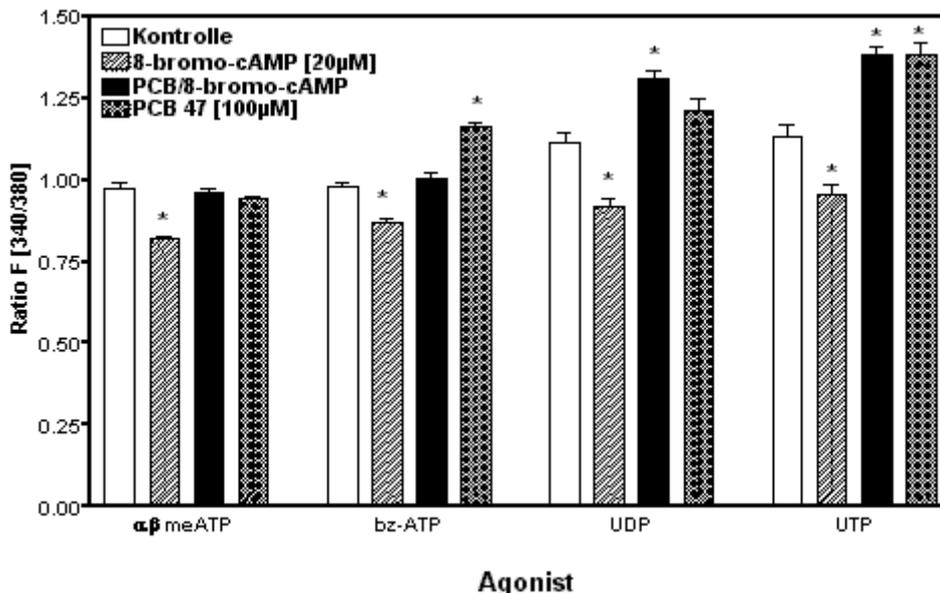


Abbildung 28: Durch verschiedene Agonisten (vgl. Abbildung 26a) induzierte Calciumleveländerungen in Kontrollen und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Zellen, nach [20µM] 8-bromo-cAMP und nach 5h PCB 47 [100µM]/ 15Minuten 8-bromo-cAMP [20µM]. CSF

Der cAMP-Agonist, 8-bromo-cAMP, führt zum Zusammenbruch aller Agonisten-vermittelten

zytosolischen Calciumerhöhungen, bei dem nur 22 % der Zellen auf einen der applizierten Agonisten reagieren. Der basale, unstimulierte Calciumspiegel in den Zellen liegt bei einer Ratio F [340/380] von etwa 0.75.

Das bedeutet, dass ein hoher zytosolischer Level an cAMP-Agonisten die meisten Rezeptoren funktionell inhibiert.

Nach 5h PCB-Applikation/15 Minuten 8-bromo-cAMP ist die Agonisten-vermittelte Calciumerhöhung bei allen Rezeptoren mindestens wieder auf dem Kontroll-Level oder demgegenüber erhöht.

Außerdem zeigt sich bei 50% der Zellen eine Veränderung des basalen zytosolischen Calciumspiegels hin zu höheren Werten (nicht gezeigt).

Der hier gezeigte inhibitorische Effekt des 8-bromo-cAMPs und die zytosolische Calciumerhöhung nach PCB 47 alleine sind an einigen Rezeptoren diametral: die durch das PCB verstärkten Antworten (s. Abbildung 26b) sind nach [20µM] 8-bromo-cAMP am P2X₇ - Rezeptor auf Kontrollniveau zu bringen.

Dies gilt nicht für die P2Y_{UDP} bzw. P2Y₂ und P2Y₄ -Rezeptoren. Hier führt ein hochgehaltener cAMP-Spiegel in Verbindung mit dem PCB 47 nicht zu einer Reduktion der Agonisten evozierten zytosolischen Calciumerhöhung. Das bedeutet, an den UTP- und UDP-abhängigen P2Y-Rezeptoren ist die PCB-induzierte Veränderung der Agonistenpotenz *cAMP unabhängig*.

Die PCB-Wirkung ist außerdem nicht auf eine Inhibition der cAMP-abhängigen Phosphodiesterasen zurückzuführen, da die PCB-Wirkung zusammen mit 8-bromo-cAMP keinen Synergismus zeigt.

Schlussfolgerung:

Die Funktionen aller getesteten Rezeptoren sind sensitiv gegenüber einem erhöhten cAMP-Spiegel in den Zellen.

Nach PCB- Behandlung ist die induzierte Zunahme der Agonisten-vermittelten Antworten an den benzoyl-benzoyl-ATP-Rezeptoren cAMP-sensitiv. An den P2Y_{UTP} und Y_{UDP} -Rezeptoren verhindert die PCB 47-Präinkubation die Blockade der Rezeptorantworten durch 8-bromo-cAMP, was zu der Annahme führt, dass PCB 47 den zytosolischen cAMP-Spiegel verändert.

Dies zu überprüfen, wurde ein cAMP-Enzym-Immuno-Assay (cAMP-EIA) durchgeführt (s. Kapitel 12). Der hier beobachtete Effekt des cAMPs beruht demnach nicht, wie man vermuten könnte, auf einer durch das stark lipophile PCB veränderten Aufnahme des 8-bromo-cAMPs in die Zellen.

(8.2) hohe zytosolische cGMP-Spiegel nach 8-bromo-cGMP:

Für die einzelnen Rezeptorarten mit 100µM PCB 47 und 125µM 8-bromo-cGMP, ergibt sich folgendes Bild:

Nach Applikation von 125µM 8-bromo-cGMP sind die Antworten über allen Rezeptoren, wie sich auch schon für cAMP gezeigt hat, im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert, ausser bei den P2X_{1/3}-Rezeptoren und dem P2X₇-Rezeptor, die folglich als unempfindlich für erhöhte cGMP-Level anzusehen sind.

Erstaunlicher Weise ist die Antwort an den P2X_{1/3}-Rezeptoren nach PCB/cGMP drastisch erhöht und verlängert, obwohl der Rezeptor selber unempfindlich für PCB 47 oder cGMP allein ist. Das bedeutet, ein hoher Gehalt an zyklischem cGMP in Verbindung mit PCB führt zu einer synergistischen positiven Rezeptormodulation, obwohl diese Rezeptoren ionotrope Proteine sind und eine Modulation durch zweiwertige Kationen beschrieben ist (Zink, Nickel, Kupfer und Mangan, aus: review Ralevic, Burnstock, 1998), und diese Rezeptoren gewöhnlich sehr schnell inaktivieren (1-3 Millisekunden).

8-bromo-cGMP führt bei allen anderen Rezeptoren zu einer signifikanten Reduktion der Rezeptorfunktion nach Agonisten.

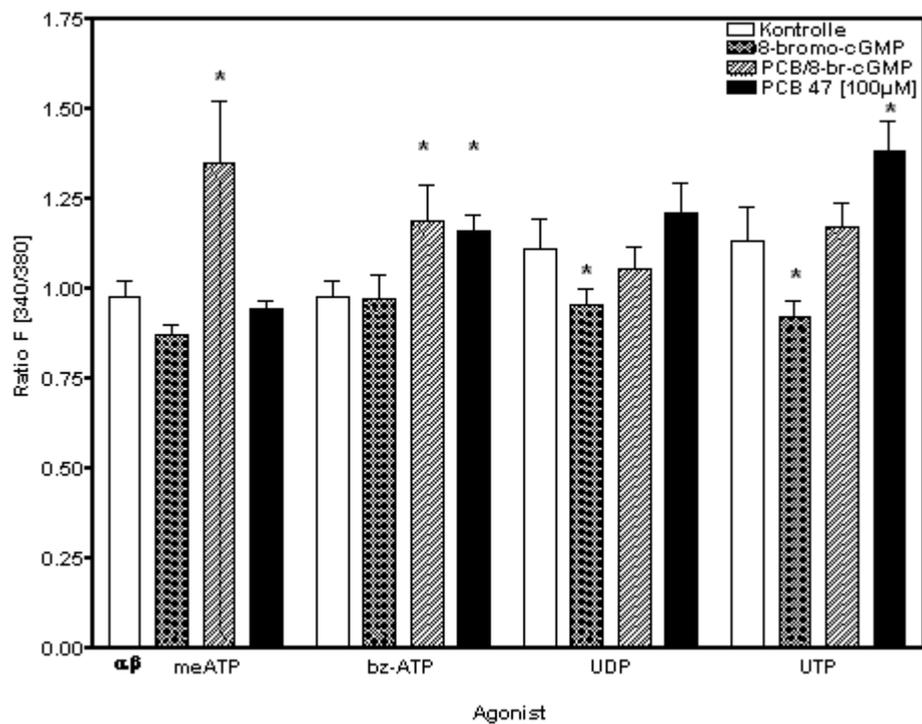


Abbildung 29: Durch verschiedene Agonisten induzierte Calciumleveländerungen in Kontrollen und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Zellen nach 15 Minuten [125µM] cGMP-Agonisten, 8-bromo-cGMP. CSF

Ein hoher Spiegel an zyklischem Guanosinmonophosphat ändert die durch Agonisten evozierten Calciumspiegeländerungen nach αβ-meATP und dibenzoyl-ATP nicht. Die durch UDP und UTP

verursachten Calciumspiegeländerungen sind aber gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant reduziert.

Die Wirkung von PCB/8-bromo-cGMP an den P2Y_{UTP}- und P2Y_{UDP}- Rezeptoren ist verschieden von der PCB-Applikation alleine. Das bedeutet, dass die PCB-Wirkung an diesen Rezeptorarten *cGMP-sensitiv* ist.

PCB-Präinkubation in Verbindung mit 8-bromo-cGMP hat keinen Einfluss auf die Rezeptorantworten von P2X₇, das heißt, am P2X₇-Rezeptor ist die PCB-induzierte Zunahme der Suszeptibilität des Rezeptors nicht durch 8-bromo-cGMP reversibel und damit nicht abhängig von einer Veränderung des cGMP-Levels in den Zellen.

Die zytosolische Calciumerhöhung nach $\alpha\beta$ -meATP bei PCB/8-bromo-cGMP ist drastisch signifikant erhöht und, wie nicht aus der Abbildung hervorgeht, im Zeitverlauf verlängert.

Damit ergibt sich für die verschiedenen Agonisten und deren Rezeptoren folgendes Bild:

Die PCB-induzierte Zunahme des Calciumspiegels am P2X₇-Rezeptor ist- im Gegensatz zu denen der UDP-/UTP-spezifischen Rezeptoren - durch einen erhöhten cGMP-Level in den Zellen *nicht* auf Kontrollniveau zu blocken, das heißt, die PCB-verursachte Suszeptibilitätszunahme an diesen Rezeptoren ist *cGMP-insensitiv* wenn auch cAMP-empfindlich. Bei den P2Y-Rezeptoren sind die Verhältnisse genau umgekehrt: diese sind *cAMP-insensitiv* aber cGMP-empfindlich.

Ob die veränderten Rezeptorantworten nach PCB 47 in Verbindung mit einer Verringerung des zytosolischen Levels an zyklischen Nukleotiden auf einer Inhibition der Zyklasten, also Adenylatzyklase und Guanylatzyklase, oder auf einem relativ gesteigertem Abbau durch die entsprechenden Phosphodiesterase-Systeme beruhen, wird zu klären sein. Für letzteres spricht allerdings, dass die regulatorischen Funktionen beider zyklischer Nukleotide betroffen sind und die vorherrschenden Phosphodiesterasen sensitiv sind für sowohl cAMP und cGMP.

Phosphodiesterasen vom Typ I sind abhängig von sowohl cAMP als auch cGMP, werden aber durch die Calcium-Calmodulinkinase aktiviert.

Während eine Inkubation der Zellen mit [10nM] KN-62 praktisch keine Auswirkungen auf die Rezeptorfunktionen hat, führt diese in Verbindung mit einer PCB-Vorinkubation zum Zusammenbruch aller Rezeptorantworten. Womit dies zusammenhängt, wird ebenfalls in Kapitel 13 bzw. 15 beantwortet werden: denn die PCB-verursachte Verringerung der zyklischen Nukleotidspiegel ist präventiv durch KN-62-Vorinkubation zu verhindern. Das bedeutet, KN-62 zusammen mit dem PCB führt zu einem relativ erhöhten Spiegel an zyklischen Nukleotiden und dadurch sekundär verringerten Rezeptorfunktionen.

Ein möglicherweise nach PCB 47 verringerter Gehalt an zyklischen Nukleotiden einerseits steht einem Calciumcalmodulinkinase-vermittelten Abbau andererseits gegenüber, insofern sind hier beide Seiten zu betrachten.

Das, was für KN-62, 8-bromo-cAMP und 8-bromo-cGMP gilt, gilt auch für den Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase in Kombination mit dem PCB 47, NAA/PCB: die Rezeptorantworten brechen zusammen.

Da UTP und UDP nicht eindeutig zwischen verschiedenen P2Y-Rezeptoren unterscheiden (s. Einleitung), wurden Desensitivierungsversuche mit wiederholter UTP/UDP-Applikation durchgeführt. Dabei wurden in der Calciumspektrofluorimetrie in achtminütigem Abstand wiederholt UTP bzw. UDP [100µM] gegeben.

	UTP- Erstantwort bei:	UTP- Zweitantwort bei:	Desensitivierung:	UDP- Erstantwort bei:	UDP- Zweitantwort bei:	Desensi- tivierung:
Zellen	5 von 8	4 von 8	4 von 8	4 von 8	5 von 8	4 von 8
AUC	48.37 ± 6.74	18.54 + 5.79	61.67 %	25.76 +.5.62	6.49 + 3,09	74.80 %
Keine Antwort:	3 (8)	4 (8)	28.13%	4 (8)	3 (8)	25.20 %

Tabelle 3: Quantifizierung der UTP/UDP-Antworten in der Calciumspektrofluorimetrie nach wiederholter Agonisten-Applikation innerhalb von jeweils 8 Minuten.

4.1.9 Konzentrations-Effektbeziehung für 2' & 3'-o-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP

Die benzoyl-benzoyl-ATP-Konzentrations-Effektbeziehung am P2X₇-Rezeptor wurde für Studien zur Rezeptorregulation erstellt. Das Maximum liegt bei einem Ratio von F [340/380] = 1.44 und ist damit höher als die Maximalwerte der Bindungskurve von ATP bei den Makrophagen, obschon laut Literatur benzoyl-benzoyl-ATP als bis zu 10 mal potenter am P2X₇-Rezeptor in Expressionssystemen im Vergleich zu ATP angegeben wird (Ralevic/Burnstock, 1997), die gezeigte Kurve hat einen EC₅₀-Wert von 56.94 µM und ist damit im Vergleich zur ATP-Konzentrations-Effektkurve rechtsverschoben.

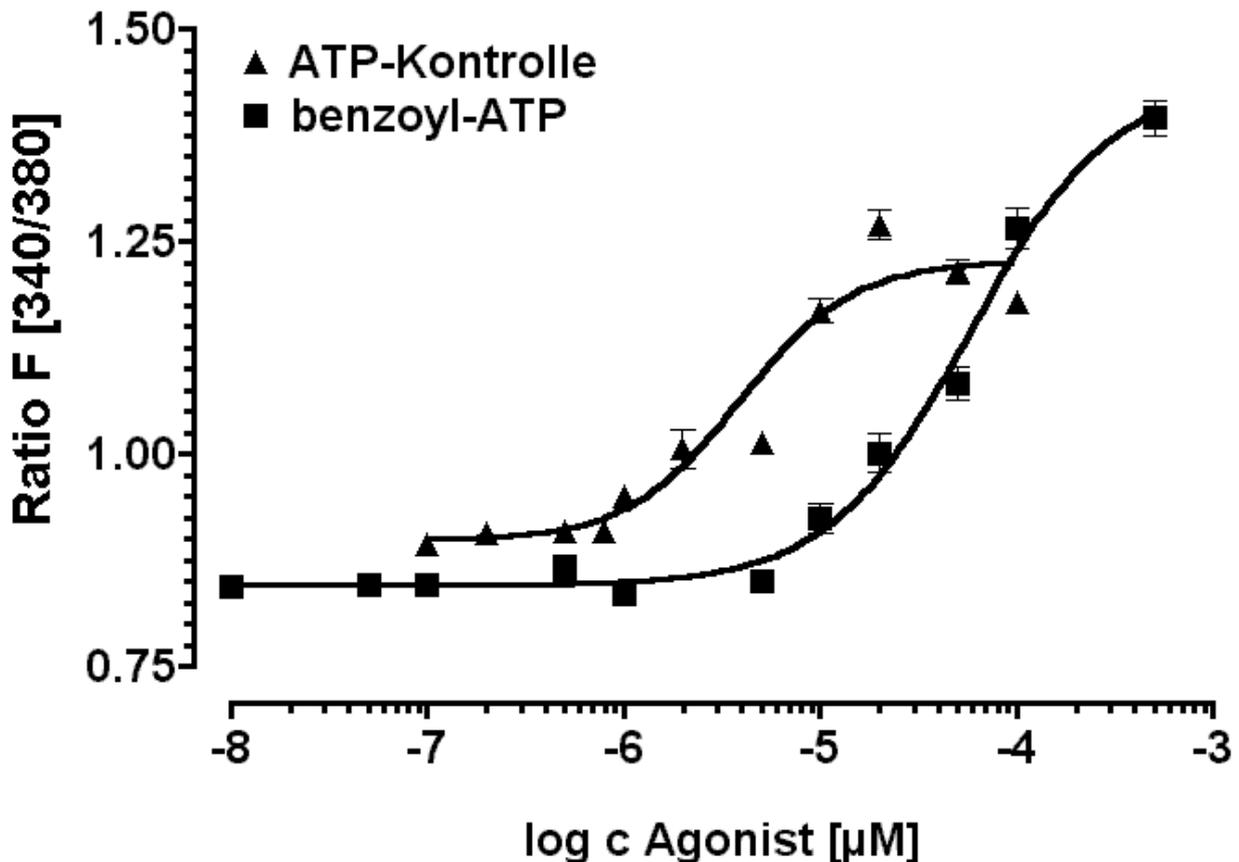


Abbildung 30: Konzentrations-Effektbeziehung für 2'-3'-(4-O-benzoyl-)benzoyl-ATP im Vergleich zur ATP-Kontrolle. Die Zellen wurden 30 Minuten lang mit Fura-2 beladen und nachfolgend bz-ATP in den angegebenen Konzentrationen superfundiert. Für jede Konzentration wurde eine neue Charge Zellen verwendet, da nach einmaliger bz-ATP-Applikation die Zellen bis zu 3h nicht mehr antworten. CSF

Der Hill-Koeffizient für bz-ATP beträgt 1.2, die Kurve kann mit einer mathematischen Gleichung für zwei (!) Bindungsstellen angepasst werden mit $r^2 = 0.98$ oder für eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve mit $r^2 = 0.99$. Daher ist anzunehmen, dass Makrophagen nicht ausschließlich einen Rezeptor für das dibenzoyl-ATP besitzen, oder verschiedene Isoformen. Der F-Test liefert im Vergleich zur ATP-Konzentrations-Effektbeziehung einen Wert von $F = 25.53$ und ist hochsignifikant. Die PCB-Versuche zur Rezeptordiskriminierung mittels Agonisten wurden mit 20µM bz-ATP

durchgeführt. 20µM entsprechen in etwa einem EC₃₀-Wert für diesen Agonisten.

Dieser Rezeptor ist nach einmaligem benzoyl-ATP-Stimulus über mehr als drei Stunden nicht wieder ansprechbar durch den Agonisten (Daten nicht gezeigt).

Auch ohne vorherige Applikation anderer Agonisten (αβ-Methyl-ATP) zeigt eine 5 stündige PCB-Vorbehandlung zu einer gesteigerten zytosolischen Calciumerhöhung nach dibenzoyl-ATP, eine komplette Konzentrations-Effektbeziehung für dibenzoyl-ATP nach PCB 47 wurde nicht erstellt.

Das bedeutet, dass der bei den Agonistenscreening-Experimenten beobachtete Effekt durch eine vorherige αβ-me-ATP-Applikation unbeeinflusst ist.

4.1.10 Phospholipasen C/D am P2X₇-Rezeptor

Nominelle Inhibitoren der Phospholipase D (Hayes, Bellington et al., 1999, Kusner, D.J., Adams, 2000) werden auch als Inhibitoren der Phospholipase C angesehen, wie etwa der kommerzielle Inhibitor U 73122 während sein Derivat, U 73343, als nicht aktiv zumindest bei humanen

- PCB 47 und PLC/PLD-Inhibitoren -

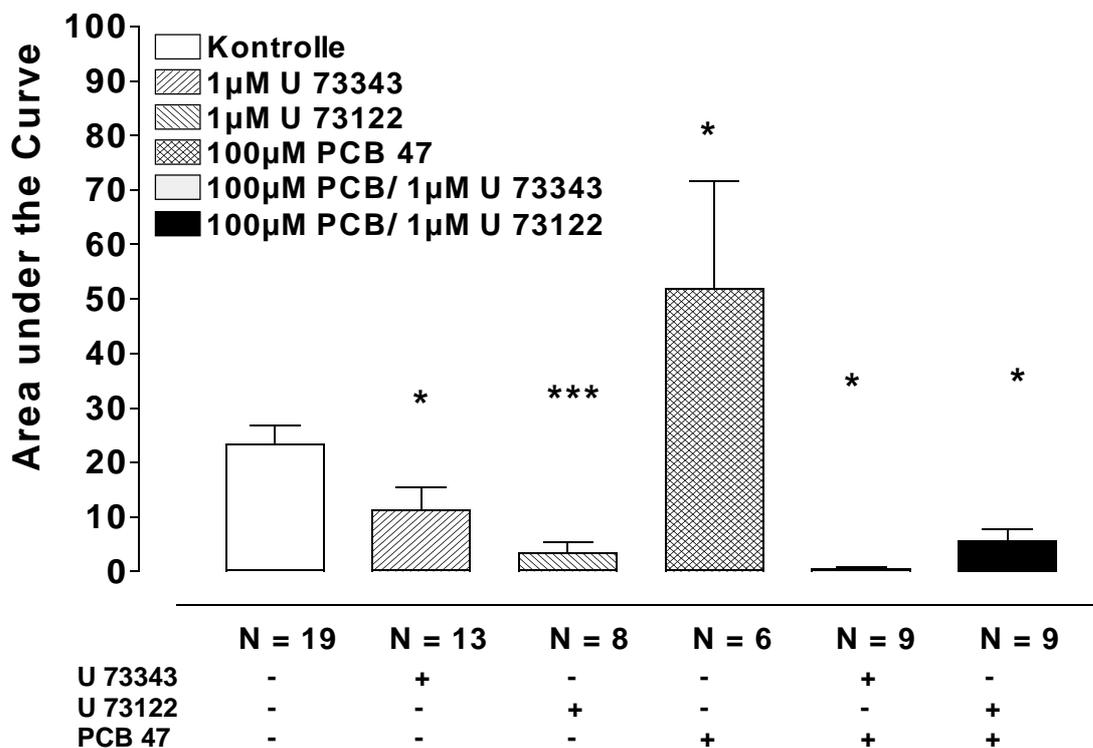


Abbildung 31: Inhibition der benzoyl-benzoyl-ATP induzierten Calciumspiegeländerungen nach PCB-Vorinkubation durch Inhibitoren der Phospholipasen C und D. Die Zellen wurden nicht (Kontrolle) oder 5h mit 100µM PCB 47 inkubiert, mit Fura beladen und mit 1µM des spezifischen aminosteroidalen Phospholipase C und D-Inhibitors U 73122 und einem Derivat, U 73343 für fünf Minuten inkubiert und nachfolgend die benzoyl-benzoyl-ATP Antwort bei 50µM gemessen. Aufgetragen in Abbildung 31 ist die Fläche unter der Kurve (AUC = area under the curve) auf der Ordinate mit der Dimension [Ratio x Sekunden] und die verschiedenen Behandlungen auf der Abszisse (s. Methodik, S. 78). CSF.

Thrombozyten und anderen zellulären Systemen beschrieben ist.

Die Darstellung der in Abbildung 31 gezeigten Veränderungen der Fläche unter der Kurve der intrazellulären Calciumerhöhung nach benzoyl-benzoyl-ATP (Area under the curve, AUC), wurde gewählt, um der Tatsache gerecht zu werden, dass die Aktivität eines Proteins der Signalkaskade, der Phospholipase D, experimentell verändert wurde.

Studiert man die Rezeptorantworten nach [50µM] benzoyl-benzoyl-ATP, was in etwa dem EC₅₀-Wert entspricht, nach [1µM] akut U 73122 oder 73343, so ergibt sich für den Phospholipaseinhibitor U73122 eine etwas stärkere Inhibition der benzoyl-benzoyl-ATP induzierten zytosolischen Calciumerhöhung als für das nach Herstellerangaben unwirksame Derivat U 73343. Für beide Stoffe zeigt sich eine signifikante Inhibition der PCB-vermittelten Zunahme der Rezeptor-suszeptibilität im Vergleich zur Kontrolle und mit PCB-Präinkubation.

Das bedeutet für die Kontrollantwort, dass die Rezeptorfunktion in erheblichem Maße von einer aktiven Phospholipase D respektive C_β abhängt.

Man sollte zwar eine partielle Inhibition der Rezeptorantworten vorhersagen können, nicht aber dass der als ionotropes Protein beschriebene Rezeptor selber nicht mehr funktionell ist.

PCB 47 [100µM] Vorinkubation führt an dem P2X₇-Rezeptor zu einer gesteigerten intrazellulären Calciumerhöhung nach benzoyl-ATP.

Nach PCB 47 und U73122 bricht die Rezeptorantwort vollkommen zusammen, das könnte bedeuten, dass das PCB zu einer Funktionsverstärkung der Phospholipasen führt, andererseits aber eine Inhibition der Phospholipasen zu einer Funktionsverminderung des Rezeptors, während die Inhibition durch die aminosteroidalen Phospholipase C/D-Inhibitoren unabhängig von der PCB-Inkubation ist.

Das PCB ist nicht in der Lage, die Inhibition durch U 73122 und U 73343 aufzuheben, wobei mit und ohne PCB im Ansatz für U 73122 kein Unterschied besteht, hingegen die durch U 73343 reduzierte Rezeptorantwort im PCB/U 73343 Ansatz noch weiter (hochsignifikant) reduziert ist.

Das Target für das PCB ist nicht die Inhibition der Phospholipase C_β oder D, was einerseits die Agonistenversuche belegen, zum anderen die in Abbildung 31 gezeigten Experimente mit den Phospholipaseinhibitoren und drittens die im folgenden Abschnitt gezeigten Calcium-Entzugsexperimente.

4.1.11 Calcium-Entzugsexperimente

(1) PCB-Vorbehandlung und extrazellulärer Calciumentzug in 8 bis 13 Tage alten Zellen:

Über G_s -Protein-gekoppelte Mechanismen lösen alle P2Y-Rezeptoren mit Ligandenspezifität für ATP eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels aus, meist über den zweiten Botenstoff IP_3 (review: Ralevic und Burnstock, 1998), das nach Phospholipase-Aktivierung durch das G-Protein generiert wird und über entsprechenden Rezeptoren der zytosolischen Speicher Calcium mobilisiert. Sollte PCB 47 ausschließlich an ionotropen Ionenkanälen in die Zellphysiologie eingreifen, würde keine Veränderung der Calciumfreisetzung von intrazellulär zu erwarten sein. Sollten aber die Signalübertragungswege der P2Y-Rezeptoren PCB-moduliert sein, würde ein Ansprechen ausschließlich der metabotropen ATP-Rezeptoren eine Veränderung in der Dosis-Abhängigkeit dieser Rezeptorsysteme erwarten lassen.

Abbildung 32 zeigt die Konzentrations-Effektkurven für Humanmakrophagen nach Calciumentzug und nach extrazellulär Calciumentzug in Kombination mit 5h PCB 47 [100 μ M] Vorinkubation.

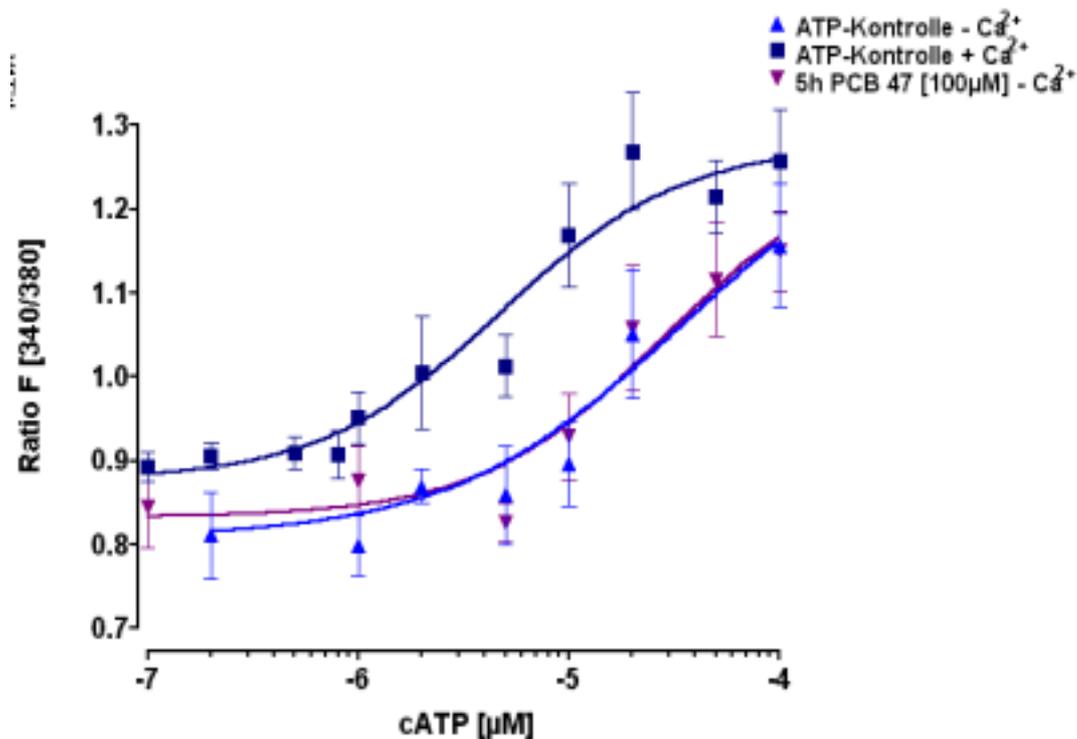


Abbildung 32: Konzentrations-Effektbeziehungen für Kontrolle mit Calcium (ATP-Kontrolle + Ca^{2+}) und Calciumentzug (ATP-Kontrolle - Ca^{2+}) und nach 5h PCB 47 [100 μ M] unter Calciumentzug extrazellulär. $N \geq 9$ Zellen. Die Zellen wurden entweder nicht (Kontrollen) oder 5h mit 100 μ M PCB 47 vorinkubiert, mit Fura beladen, und die ATP-Antworten nach 5 minütiger Perfusion in Calcium-freiem Ringer/EGTA (Na^+ -HBS ohne Calcium, '- Ca^{2+} ', ATP-Kontrolle und 5h PCB 47) aufgezeichnet. CSF

Die EC_{50} -Werte liegen für die ATP-Kontrolle mit Calcium bei 4,04 μ M, mit einem B_{max} (respektive Top-Wert) von 1,25. Unter Calciumentzug ist der EC_{50} -Wert 22,99 μ M und $B_{max} = 1,24$ bei einem r^2

von 0,99. Der F-Test ist mit $F = 58.65$ versus ATP mit extrazellulärem Calcium hochsignifikant. Nach PCB 47-Vorbehandlung und Calciumentzug ist die Konzentrations-Effektkurve im Vergleich zur Calciumentzugskontrolle unverändert ($EC_{50} \text{ Kontrolle} = 22.9$ versus $EC_{50} \text{ PCB} = 27.7 \mu\text{M}$, $B_{\text{max}} \text{ Kontrolle} = 1.13$ versus $B_{\text{max}} \text{ PCB} = 1.26$), und mit einem Wert für $F = 0.008$ nicht verschieden ($F = 17.5$ versus ATP-Kontrolle mit Calcium).

Die Fläche unter den Calcium-Entzugskurven entspricht den ATP-Rezeptor-vermittelten Calciumerhöhungen, wahrscheinlich ausgelöst über P2Y-Rezeptoren aus intrazellulären Speichern. Die Kurven verlaufen im Wesentlichen parallel, wobei die Calcium-Entzugskurven gegenüber der Kontrolle rechtsverschoben sind.

Bei $100 \mu\text{M}$ ATP ist die maximale zelluläre Antwort der P2Y-Rezeptoren noch nicht erreicht. Die PCB-Vorinkubation führt zu keiner Veränderung der über metabotrope P2Y-Rezeptoren ausgelösten Calciumspiegelveränderung bei den Humanmakrophagen aus intrazellulären Speichern.

Auch die basalen Calciumwerte nach PCB-Inkubation sind unverändert gegenüber der Kontrolle.

Das kann bedeuten, dass die über die Phospholipasen und IP_3 /Diacylglycerol getragene intrazelluläre Calciumerhöhung unbeeinflusst ist durch 5h [$100 \mu\text{M}$] PCB 47, und sich die PCB 47-Aktionen bei Humanmakrophagen im Wesentlichen auf P2X-Rezeptoren und IP_3 /DAG-*unabhängige* Signalübertragungswege bei P2Y-Rezeptoren beschränken.

Nach PCB-Vorinkubation in calciumhaltigem Ringer und Stimulation durch die verschiedenen Agonisten ist die rezeptorvermittelte Antwort nach UTP signifikant und UDP tendenziell erhöht, wobei diese Rezeptoren G-Protein-gekoppelt sind und somit zunächst von extrazellulärem Calcium unabhängig.

Makrophagen verfügen aber, wie aus der Tabelle in der Einleitung ersichtlich wird, auch über nichtselektive Ionenleitfähigkeiten, die über cAMP oder cGMP-abhängig aktiviert werden können. Desweiteren sind auch G-Protein-gekoppelte, ligandengesteuerte Mechanismen denkbar, die über das G-Protein direkt Calciumleitfähigkeiten von intrazellulär auslösen.

(2) Reifung der P2Y-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur:

In Bezug auf die P2Y-Rezeptoren bei den Humanmakrophagen ergibt sich für Zellen verschiedenen Alters eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Rezeptor-vermittelten Antworten. Dies wurde auch schon in ähnlicher Weise für Kalium-Kanäle in patch-clamp-Experimenten beobachtet (s. Charakterisierung der Zellkultur).

8 bis 9 Tage alte Zellen zeigen wesentlich stärkere Calcium-Level-Änderungen nach extrazellulärem Calciumentzug und ATP-Applikation als ältere Zellen Tag 12 bis 13 in Kultur:

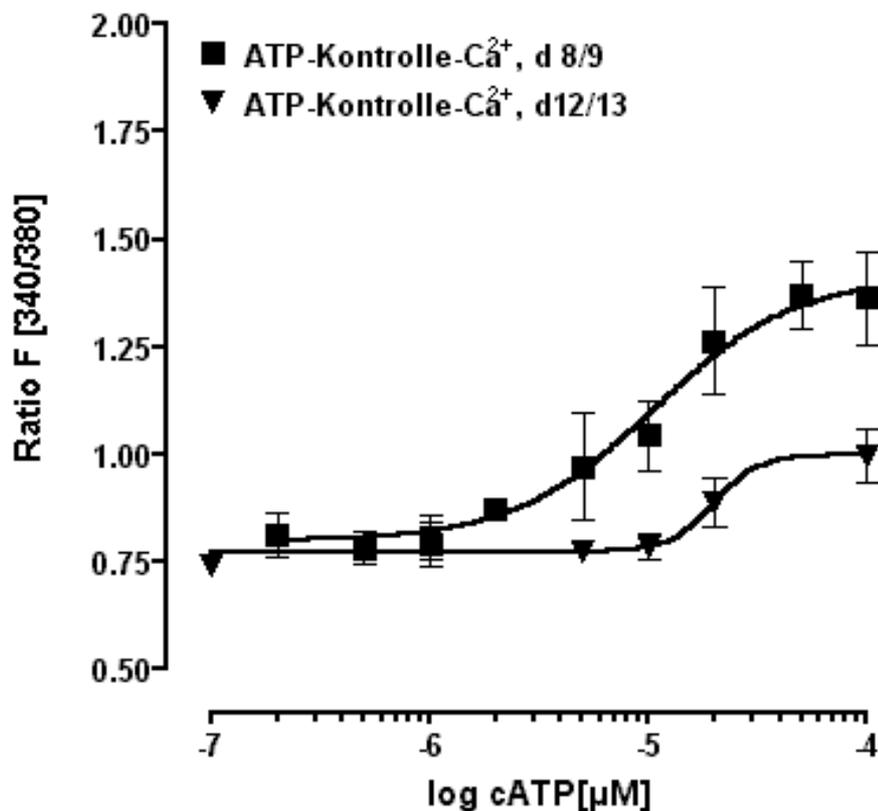


Abbildung 33: Konzentrations-Effektbeziehungen für ATP-Kontrollen nach Calciumentzug, erstellt am Tag 8/9 in Kultur und Tag 12/13 in Kultur. CSF

Die in Abbildung 32 gezeigte Konzentrations-Effektkurve wurde für Zellen zwischen Tag 8 und 13 in Kultur erstellt und Zellen jeden Alters verwendet. In Abhängigkeit vom Kulturzeitraum zeigt sich ein signifikanter Unterschied in den P2Y-Rezeptor vermittelten Antworten.

Da sich die zellulären zytosolischen Calciumerhöhungen nach [100µM] ATP im Kulturzeitraum nicht ändert [Ratio bei 7/8, 9/10 und 12/13 Tage alten Zellen etwa 1.25, $N_{ges} > 153$] bedeutet das, dass sich vermutlich das Spektrum der P2-Rezeptoren auf den Humanmakrophagen ändert: je länger in Kultur, desto mehr werden ATP-vermittelte Calciumanstiege von Ionotropen Rezeptoren getragen, desto weniger von P2Y-Rezeptoren.

Da diese Rezeptoren relativ komplex reguliert sind, können auch die Sekundärsysteme betroffen sein. 12/13 Tage alte Zellen haben einen EC_{50} von 19.8µM, 8 bis 9 Tage alte Zellen einen EC_{50} von 10.52µM.

Die Maximalwerte unterscheiden sich ebenfalls: Der B_{max} liegt bei 1,41 für die jüngeren Zellen und B_{max} 1.00 bei 12 bis 13 Tage in Kultur gehaltenen Zellen und sind statistisch hochsignifikant verschieden mit $F = 44.87$ für d8/9 versus d 12/13.

Anpassung: Behandlung:	Hyperbolisch:	Sigmoidal:						
	Bindestellen nach hyperbolischer Anpassung:	Bottom:	Top:	r^2 :	F-Test [vs. Kontrolle]:	EC_{50} [µM]:	Log EC_{50} [µM]:	Hill-Koeffizient
Kontrolle	2	0,87	1,25	0,99	---	4,04	-5,39	1,52
PCB 47	2	0,96	1,87	0,99	43,1	11,3	-4,9	
N-Acetyl-D-Arginin	1	0,98	1,53	0,99	15,64	5,2	-5,28	
PCB/NAA	1	0,84	1,35	0,97	0,32	6,72	-5,17	
XAMR	2	0,83	1,3	0,99	5,84	16,5	-4,79	
XAMR/PCB	1	0,97	1,28	0,94	0,59	3,29	-5,48	
PCB 77	1	0,88	1,41	0,98	0,07	9,74	-5,01	
Benzoyl-benzoyl-ATP	2	0,84	1,44	0,99	25,53	56,94	-4,25	1,21
ATP ohne Calcium	2	0,76	1,13	0,99	58,65	22,99	-4,28	
PCB ohne Calcium	2	0,83	1,26	0,99	17,5	27,71	-4,56	
ATP-Ca ²⁺ [d8/9]	2	0,8	1,41	0,99	*44,78	11,86	-4,93	1,37
ATP-Ca ²⁺ [d12/13]	1	0,77	1	0,99	n.d.	52,1	-4,29	4,27

Tabelle 3: Variablen aller erstellten Konzentrations-Effekt-Beziehungen mit dem jeweils optimalen Anpassungsmodell für nichtlineare Regression nach hyperbolischer Anpassung (erste Spalte) und sigmoider Anpassung (zweite bis achte Spalte). Die Kurven der sigmoidalen Anpassung wurden zum statistischen Vergleich einem F-Test unterzogen. Für Calcium-Entzugsexperimente wurden die Kurven, die bei Kulturen am Kulturtag 8 bzw. 9 erstellt wurden mit denen am Tag 12/13 erstellten verglichen. F-Werte > 3 sind signifikant.
* = (vs d12/13)

Die ersten Spalte bezieht sich auf die beste mathematische Anpassung der Kurven nach nicht-linearer Regression an ein Ein-Bindestellen-Modell oder Zwei-Bindestellen-Modell und ermittelt, ob die Behandlungen der Makrophagen den Rückschluss auf eine Veränderung der ATP-Bindestellen zulassen. Die entsprechende Anpassung nach nicht-linearer Regression für halblogarithmische sigmoidale Anpassung ist in den Spalten zwei bis acht wiedergegeben. Die sigmoidale Anpassung wurde für alle Konzentrations-Effektkurven durchgeführt als Vergleich für eine Anpassung mit der Steigung 1 und für eine Anpassung mit variabler Steigung, die einen Hill-Koeffizienten liefert. Die Anpassungsgüte ist durch r^2 wiedergegeben. Dabei erhält die bestmögliche den Wert '1', berechnet nach der Korrelation der Quadrate über den Standartabweichungen an die mathematische Funktion. EC_{50} - und $\log[EC_{50}$ -Werte] sowie der Hill-Koeffizient, der das Maß an Kooperativität angibt und somit für die Steilheit der Kurve steht, wurden nur dann angegeben, sofern das Modell eine Anpassung für ein sigmoides Modell mit variabler Steigung empfiehlt.

4.1.12 Verringerung des basalen und stimulierten zytosolischen Gehaltes an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) nach PCB 47

Damit ergeben sich für die PCB 47 [100µM]-Behandlung aus den bisher gezeigten Ergebnissen drei wesentliche Aspekte in der Beurteilung der Sensitivierung der ATP-induzierten Calciumspiegelveränderungen:

- (1) Bei gleichen ATP-Konzentrationen führt eine PCB-Vorbehandlung zu einer Verstärkung des Calciumeinstroms an funktionellen P2X₇-Rezeptoren, soweit diese durch spezifische Agonisten und Antagonisten zu testen waren, die spezifisch durch einen Inhibitor des P2X₇-Rezeptors auf den Kontroll-Level blockierbar ist, also eine Veränderung in der *Rezeptorfunktion*.
- (2) Die Expression von P2X₇-Rezeptoren in der Makrophagenkultur steigt der Anteil nach PCB 47-Vorbehandlung um etwa 7% in der Gesamtzellpopulation an, während der des P2X₁-Rezeptors konstant bleibt. Das spricht unter anderem für eine differentielle Kontrolle der Expression dieser beiden Rezeptoren, die durch das PCB 47, einen Phenobarbital-ähnlichen Induktor bestimmter Cytochrome (s. Einleitung) verändert ist. Also eine *veränderte P2X₇- Expression*.
- (3) Die physiologischen Aspekte einer PCB 47-Inkubation bei Humanmakrophagen führen im Wesentlichen zu Veränderungen des ionotropen Rezeptorsystems bei Liganden-gesteuerten purinergen Calciumkanälen. Bei den metabotropen ATP-spezifischen Rezeptoren sind nicht die Phospholipase C- gekoppelten Signalübertragungswege mit Inositol-3-Phosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), die nach Aktivierung zu einer intrazellulären Calciumfreisetzung führen, betroffen, wie die Calciumzugsexperimente zeigen. *Keine Veränderung der IP₃/ und DAG-getragenen sekundären Signalübertragungswege*.

Nach den Ergebnissen der Agonistenversuche und Konzentrations-Effektkurven wurde nachfolgend die Hypothese getestet, die Funktionen der Purinrezeptoren nach PCB seien auf veränderte Level an zyklischen Nukleotiden zurückzuführen, durch entweder eine direkte Veränderung der cAMP oder cGMP generierenden Enzymsysteme oder sekundär infolge verringerten NO-Levels in den Zellen. Dessen Verringerung als Folge der PCB-Behandlung wurde ohne LPS-Induktion nicht überprüft.

(a) Bestimmung des basalen zytosolischen cAMP-Spiegels nach Vorinkubation mit verschiedenen PCB 47-Konzentrationen [10nM bis 100µM]

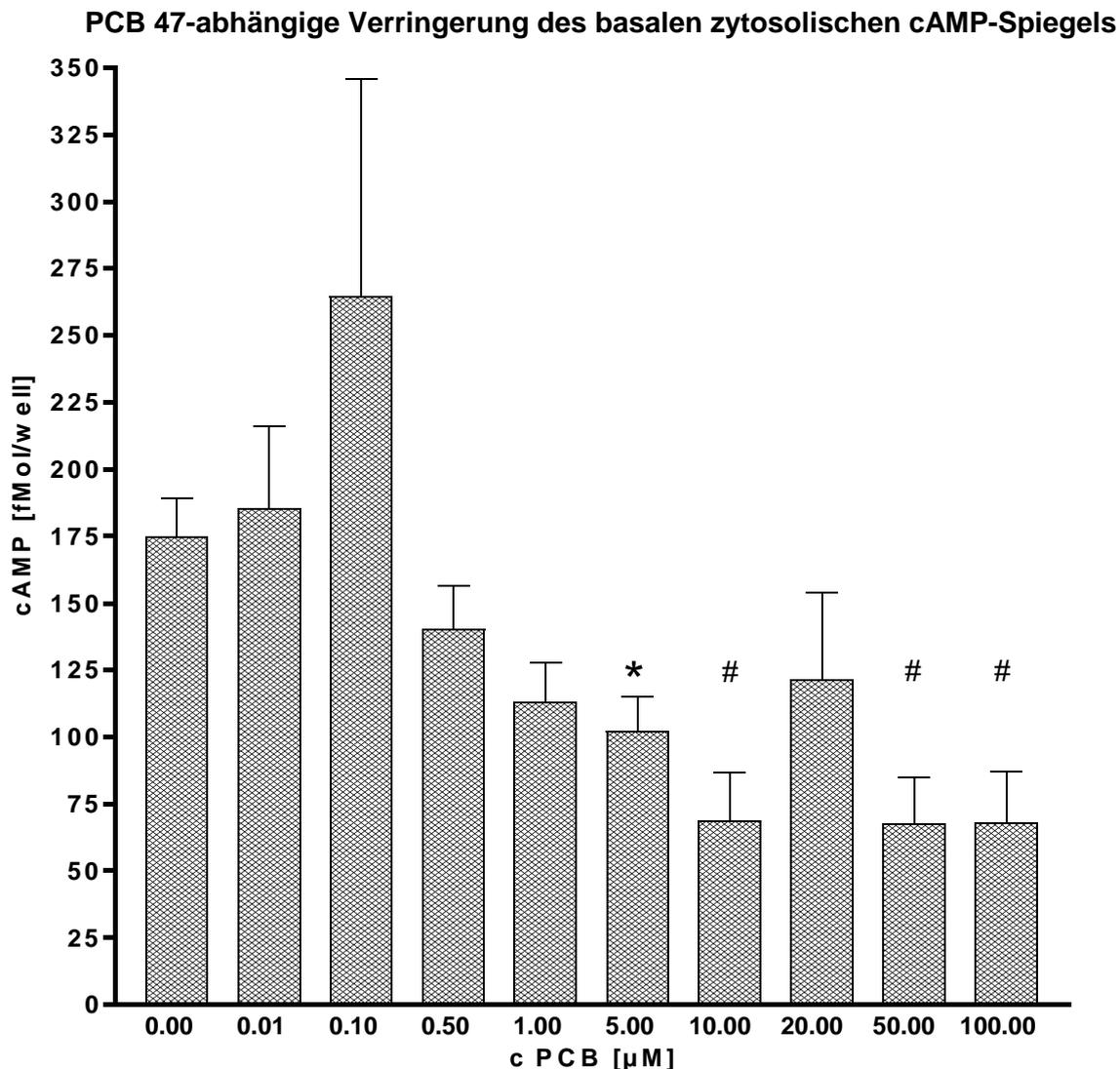


Abbildung 34: cAMP-Spiegel bei PCB 47 vorbehandelten Humanmakrophagen
Die in 96-well-Kulturplatten kultivierten Makrophagen (2×10^5 Zellen/Vertiefung) wurden über 5h mit PCB-belastet, die Zellen lysiert und im cAMP-EIA die cAMP-Werte der Zellen bestimmt. Signifikanzen: * = $p < 0.05$, # = $p < 0.01$ versus Kontrolle. EIA

Die in Abbildung 34 dargestellte Konzentrations-Inhibitionskurve für PCB 47 zeigt auf der X-Achse die PCB-Konzentrationen, auf der Y-Achse die ermittelten Konzentrationen für zelluläres cAMP in fMol/well.

Die angegebenen cAMP-Werte resultieren aus drei Assays mit Dreifachbestimmungen, deren Absorptionswerte abzüglich derer für Nicht-spezifische Bindung (NSB) nach der Assay-Vorschrift aus der Standard-Kurve ermittelt wurden.

Der IC_{50} -Wert der Kurve liegt bei 586 nM, ab 5 μ M sind die Werte, mit Ausnahme des 20 μ M PCB-Wertes, signifikant verschieden von der Kontrolle.

Da die Zytotoxizitäts-Bestimmung im mitochondrialen Tetrazoliumtest bei fünf Stunden definitiv keine Veränderungen der absoluten Zellzahl zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich die Zellphysiologie betroffen ist, nicht die Zahl der in Kultur nach PCB-Vorbehandlung verbleibenden Zellen. Die Kurvenanpassung in der nicht-linearen Regression erfolgte nach einem mathematischen Modell für Kompetition für eine Bindungsstelle (one-site-Competition).

(b) Zytosolischer cAMP-Spiegel nach 5h 25µM Forskolin und variierenden PCB 47

Konzentrationen

Die Verringerung des evozierten cAMP-Spiegels nach PCB 47 zeigt sich nicht in Kombination mit

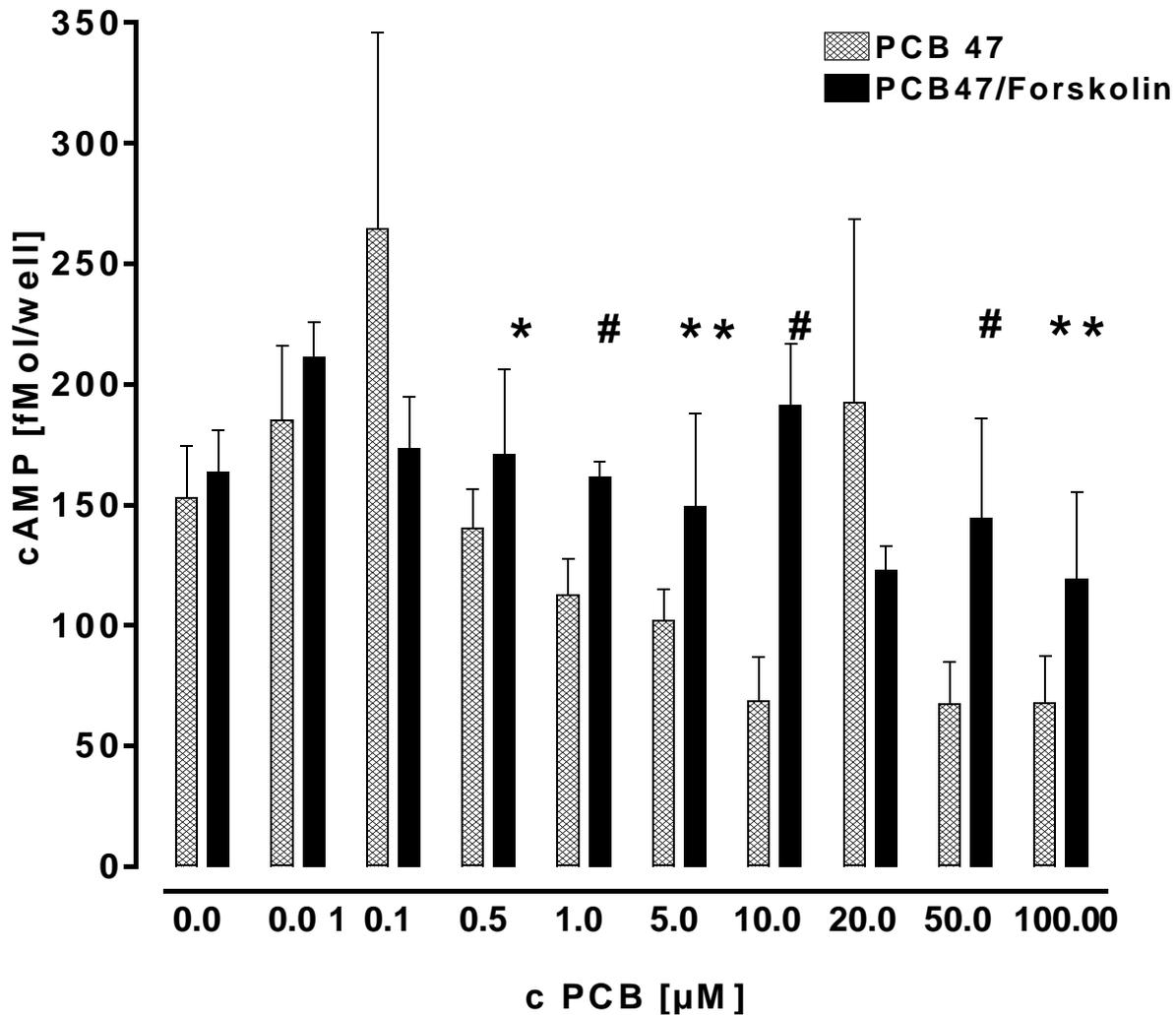


Abbildung 35: Zytosolischer cAMP-Spiegel nach 5h PCB 47 im Vergleich zu 5h 25µM

Forskolin/PCB 47. Die Zellen wurden in 96er Mikrotiterplatten über 5h in Dreifachansätzen entweder mit verschiedenen PCB 47-Konzentrationen stimuliert oder mit 25µM Forskolin/verschiedenen PCB 47 Konzentrationen und die zytosolischen cAMP-Spiegel in den Zellen bestimmt. Signifikanzen: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, # = $p < 0.001$ im Forskolin/ PCB 47-Ansatz gegenüber der entsprechenden Behandlung nur mit PCB alleine. Erklärungen siehe Text. Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Assays. EIA

dem rezeptorunabhängigen Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin, einem Diterpen.

Die cAMP-Spiegel im Forskolin/ PCB 47 stimulierten Ansatz sind ab 0.5µM signifikant verschieden von den PCB 47-Konzentrationen alleine. Im Vergleich zur Forskolinkontrolle ist keiner der anderen Forskolin/PCB 47-Ansätze signifikant verschieden. Das bedeutet, dass das PCB 47 im Forskolin-stimulierten Ansatz den cAMP-Spiegel nicht verändert, sondern spontan zu einer Veränderung des cAMPs führt. Die Signifikanzen im PCB 47-Ansatz wurden aus Übersichtsgründen weggelassen.

(c) Verringerung des zytosolischen cAMP-Spiegels durch den Stickstoffoxydsynthase-Inhibitor N^G-Amino-L-Arginin

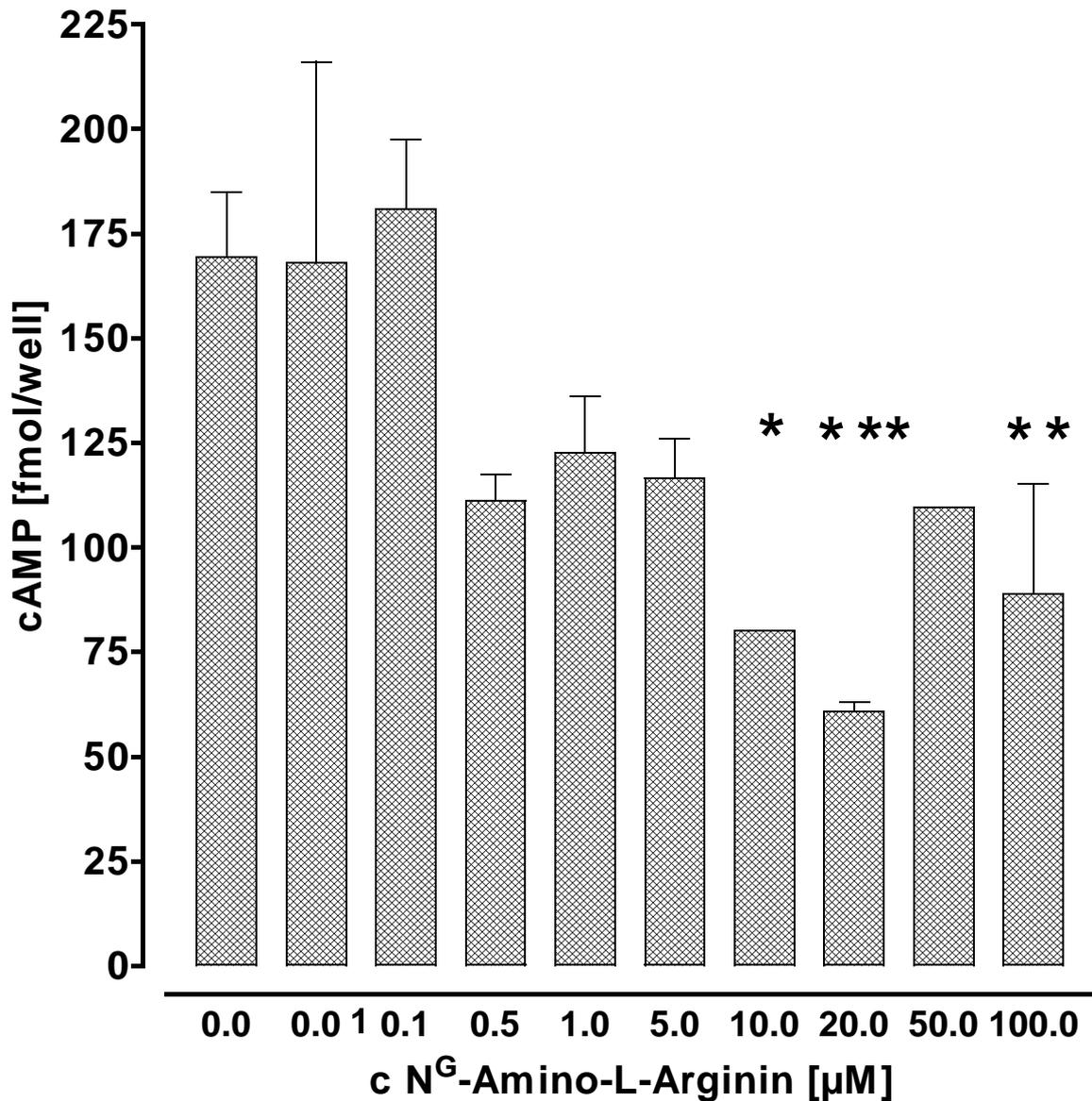


Abbildung 36: cAMP-Verringerung durch Stickstoffoxydsynthase-Inhibition. Zwölf Tage alte Humanmakrophagen wurden in 96er Mikrotiterplatten 1.5 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase, N^G-Amino-L-Arginin vorbehandelt und die zytosolischen cAMP-Spiegel im Enzym-Immuno-Assay bestimmt. Signifikanzen: * = p >0.05, ** = p >0.01, *** = p >0.001. EIA

Auch der Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase, N^G-Amino-L-Arginin, führt bei 1.5h Vorbehandlung konzentrationsabhängig zu einer Verringerung des zytosolischen cAMP-Spiegels in den Makrophagen. Dargestellt sind hier die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Assays.

Der IC_{50} -Wert für NAA liegt bei 394 nM in der sigmoiden Anpassung mit konstanter Steigung, die statistisch besser die Lage der Datenpunkte beschreibt als die sigmoide Beschreibung mit variabler Steigung. Das bedeutet, dass auch eine iNOS-Inhibition durch einen spezifischen Stickstoffoxydsynthaseinhibitor zu einem veränderten cAMP-Spiegel in den Zellen führt, der die Ligandenempfindlichkeit der ATP-Rezeptoren bestimmt.

4.1.13 TNF- α -Freisetzung nach PCB 47

Da ein Rezeptortyp, der offensichtlich selber in die Regulation der iNOS involviert ist (siehe Kapitel Immunhistochemie), P2X₇, PCB-sensitiv ist (s. Agonisten) und die induzierbare NOS durch NF- κ B auf der DNA-Ebene reguliert wird, war fraglich, ob downstream der Rezeptoren möglicherweise Entzündungsparameter nach PCB-Vorbehandlung ansteigen oder verändert sind.

Dazu wurde ein relativ ubiquitärer Transskriptionsfaktor, der NF- κ B-regulierte Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ausgewählt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 10 μ g/ml Lipopolysaccharid vorbehandelt, mit 100 μ M PCB 47 [5h], mit 100 μ M ATP, 10 μ M benzoyl-benzoyl-ATP, oder nicht als unbehandelte Kontrolle.

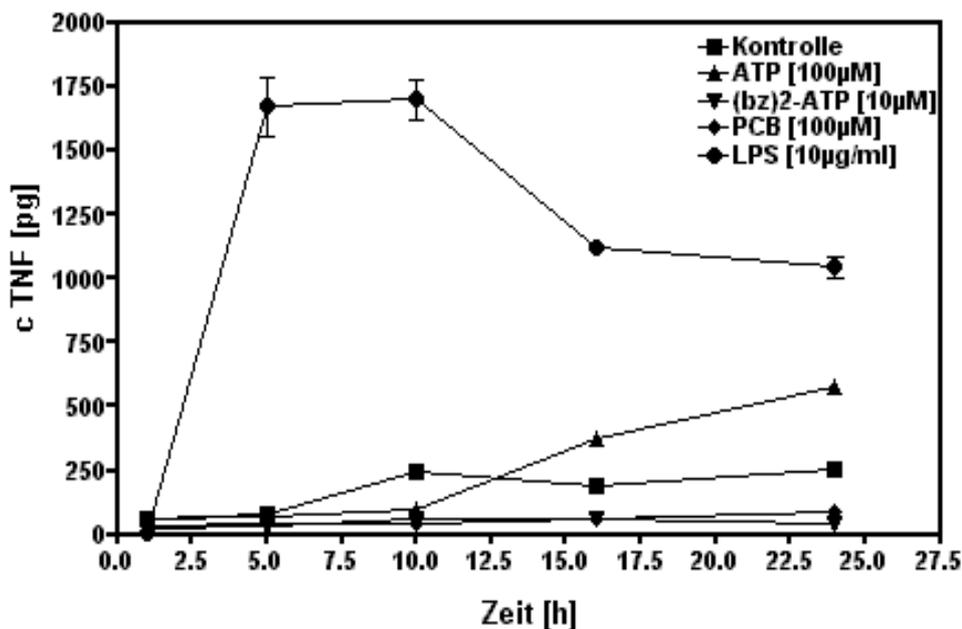


Abbildung 37: TNF α -Freisetzungsexperiment nach Kontrolle, 30 Minuten LPS [10 μ g/ml], 5h 100 μ M PCB und 100 Sekunden ATP- bzw. benzoyl-benzoyl-ATP. Die TNF-Freisetzung in der Kultur wurde mittels Sandwich-ELISA und rekombinanten humanen TNF als Standard bestimmt. Der Nachweis erfolgte über Biotin-Phycoerythrin mit einem monoklonalen α hu TNF α -Antikörper. Dreifachbestimmungen. *ELISA*

Es gibt keine PCB-abhängige TNF α - Freisetzung bei Humanmakrophagen. Die LPS-Positivkontrolle ist nach fünf bis zehn Stunden im Maximum bei 1700pg TNF und nimmt nach sechzehn bzw. 24h wieder leicht ab, was eventuell durch eine Wiederaufnahme des freigesetzten TNFs erklärt werden kann.

Die unbehandelte Kontrolle steigt nach zehn bis vierundzwanzig Stunden leicht an bis zu einem Endwert von 250pg.

Im benzoyl-benzoyl-ATP-Ansatz sowie nach PCB-Vorbehandlung liegen die Werte mit 43 bis 60pg unterhalb der linearen Nachweisgrenze, es kommt hier also zu keiner messbaren TNF α -Freisetzung.

Relativ zur unbehandelten Kontrolle müsste man hier eigentlich von einer Inhibition sprechen, da andernfalls ein der Kontrolle ähnlicher Zeitverlauf zu erwarten ist.

Nach ATP-Vorbehandlung steigt zwischen zehn und sechzehn Stunden der TNF- α -Level kontinuierlich an bis zu einem Endwert nach 24h von 600pg.

Nach Exposition mit entweder LPS oder 5 Stunden PCB 47 und Intervention mit 10 μ M benzoyl-benzoyl-ATP sind die Messwerte für TNF- α nach 16 h unverändert im Vergleich zu den in Abbildung 38 gezeigten Daten (nicht gezeigt).

Aktivierung des P2X₇-Rezeptors nach LPS oder nach PCB 47 verändert also die Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase (wie in der Immunhistochemie gezeigt), nicht aber die spontane oder LPS-induzierte TNF- α -Freisetzung.

(b) TNF- α -Boten-Ribonukleinsäure (TNF α -m-RNA) nach PCB 47

Die Frage, ob die in den Release-Experimenten beobachtete fehlende oder inhibierte TNF α -Freisetzung durch PCB bzw. benzoyl-ATP auf einer Inhibition des NF-kB-regulierten TNF- α -Gens oder auf einem verhinderten Freisetzungsmechanismus beruht, wurde auf m-RNA-Ebene die Genexpression durch Reverse-Transkription Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) studiert.

Da Zytokinfreisetzung in eukaryontischen Zellen ein komplexer Mechanismus ist, wäre auch eine Inhibition auf ribosomaler- oder Golgi-Ebene denkbar.

Aus der RT-PCR ergaben sich keine Hinweise darauf, dass in den Zellen nach PCB 47-Vorbehandlung eine veränderte Menge TNF- α -Boten-RNA im Vergleich zur Kontrolle vorliegt (Daten nicht gezeigt).

4.1.14 zyklisches Guanosin triphosphat, cGMP

(a) PCB 47- bzw. N^G-Amino-L-Arginin-abhängige Verringerung des zytosolischen cGMP-Spiegels:

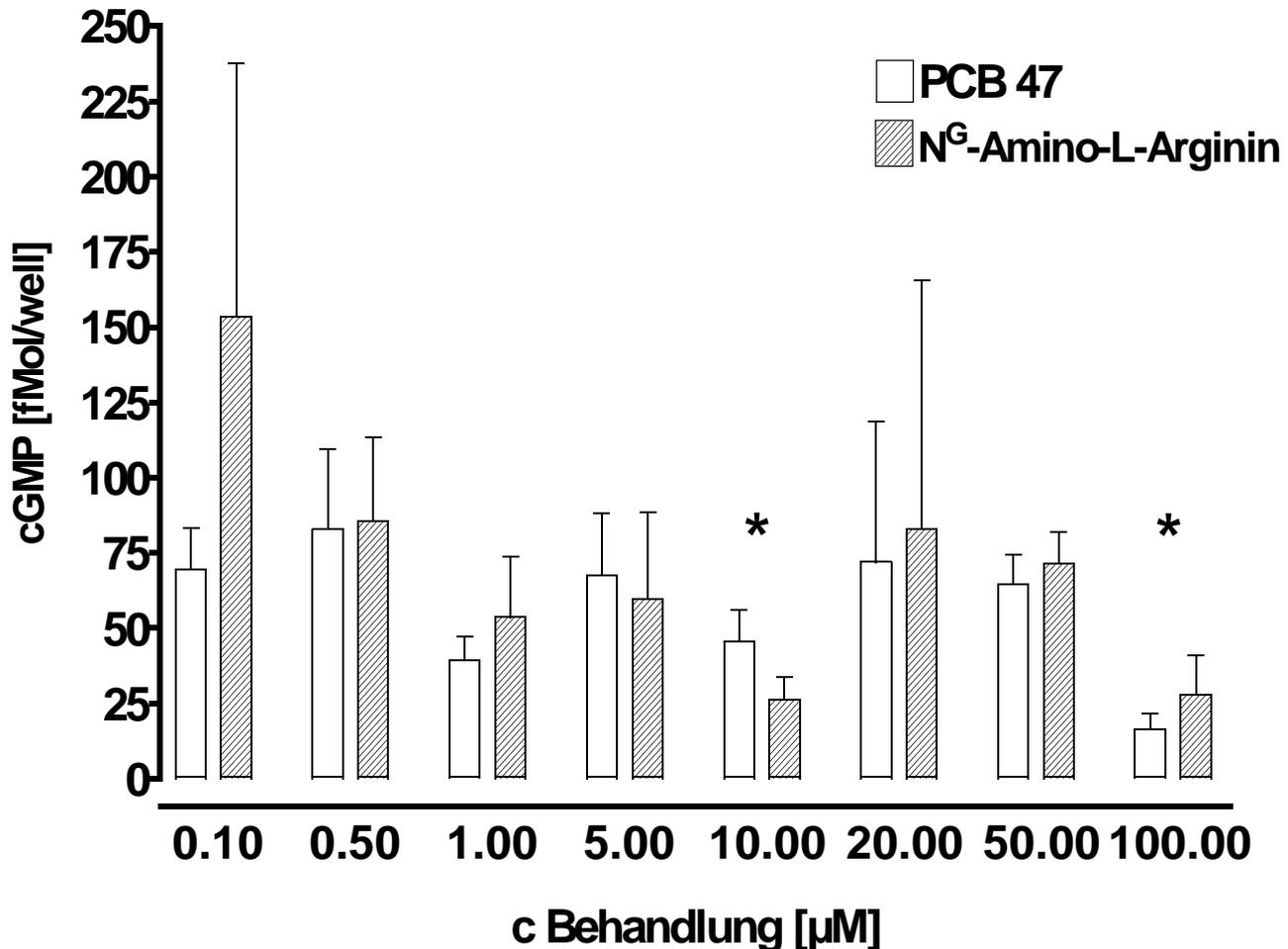


Abbildung 38a: N^G-Amino-L-Arginin und PCB 47 induzierte Verringerung des zytosolischen Spiegels an zyklischem Guanosinmonophosphat, cGMP. Die Zellen wurden 1.5h (NAA) oder 5h (PCB 47) behandelt und die cGMP-Level im EIA bestimmt. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit 118.81 fMol zeigt sich für NAA bei 10nM eine Erhöhung, darüber eine deutliche Inhibition, die bei PCB 47 nur bei Konzentrationen jenseits der 0.5μM zu beobachten sind. *EIA*

Der Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthese führt, wie auch in verschiedenen anderen zellulären Systemen bereits beschrieben (Holm et al.1999) ebenfalls zu einer Verringerung des zytosolischen Spiegels an zyklischem Guanosinmonophosphat, cGMP, mit einem IC₅₀-Wert aus der nicht-linearen Regression in der einphasigen exponentiellen Abnahme von 172 nM.

In einem weiteren Ansatz wurden Zellen mit dem NO-Donor SNAP (S-Nitroso-D,L-Penicillat) [25μM] 30 Minuten vorinkubiert und anschliessend für fünf Stunden PCB 47 zugesetzt. Ohne PCB 47 führt SNAP zu cGMP-Spiegeln von 121,3 ± 40,74fMol.

(b) synergistische Veränderung des zytosolischen cGMP-Spiegels durch 5h PCB 47/ 1.5h 10 μ M N^G-Amino-L-Arginin [10 μ M]

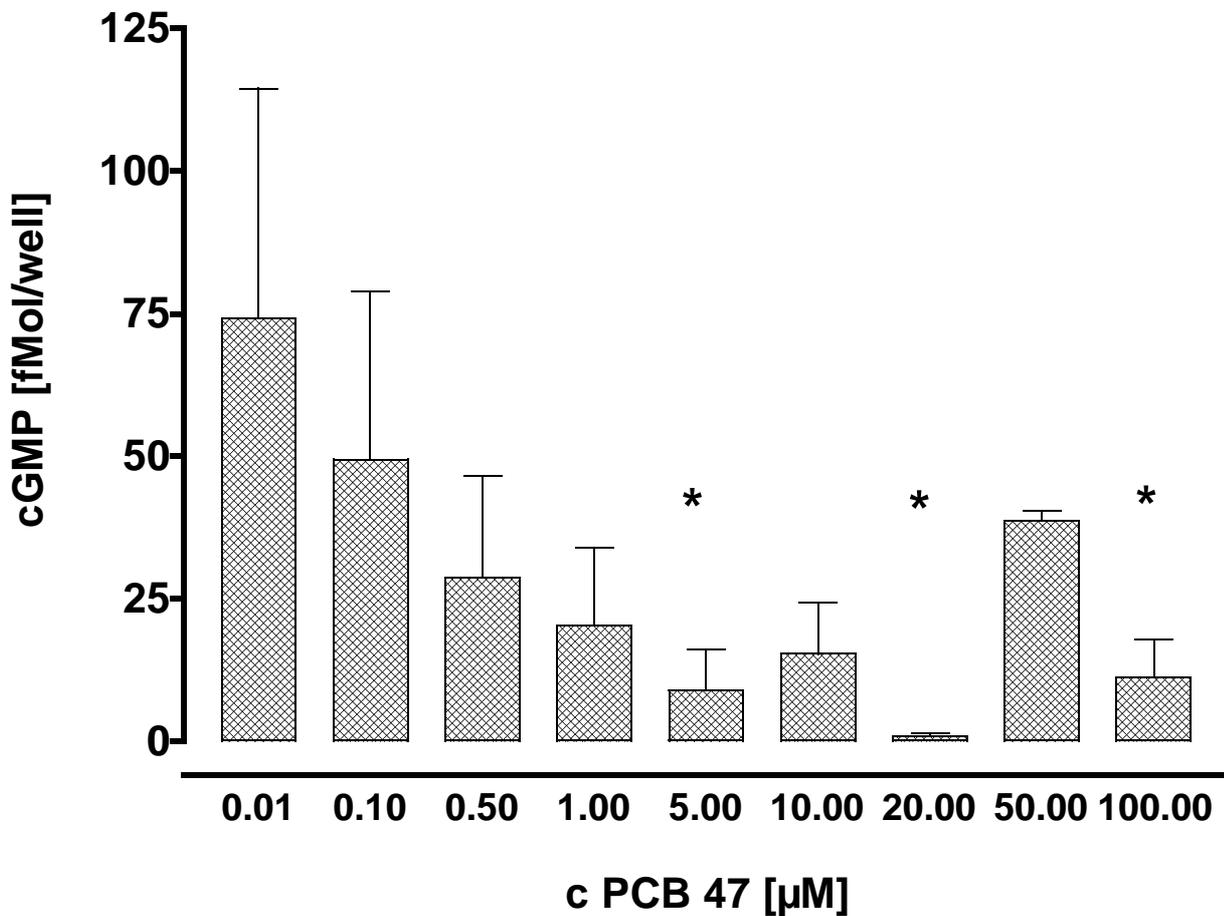


Abbildung 38b: zytosolische cGMP-Verringerung durch PCB 47/N^G-Amino-L-Arginin. In Dreifachansätzen wurden jeweils 2×10^5 Zellen in 96er Mikrotiterplatten für 3.5h PCB 47 und 1.5h PCB 47/N^G-Amino-L-Arginin belastet und nachfolgend im EIA die zytosolischen cGMP-Level im Acetylierungsverfahren bestimmt. Signifikanzen: * = $p < 0.05$. EIA

Im Vergleich zu 10 μ M NAA, nach dessen Vorbehandlung die zytosolischen cGMP-Werte bei etwa 25 fMol/ 2×10^5 Zellen liegen, führt die Kombination aus PCB und NAA zu einer nochmals deutlichen Verringerung des cGMPs in den Zellen.

Die gleichen Ansätze führen in der Calciumspektrofluorimetrie zu einem totalen Zusammenbruch der 100 μ M ATP- induzierbaren zytosolischen Calciumerhöhung.

Ein sehr niedriger cGMP-Spiegel verändert also offensichtlich funktionell die Purinrezeptoren ebenso wie ein nach 8-bromo-cGMP-Applikation potentiell zu hoher cGMP-Spiegel (vergleiche: Konzentrations-Effektbeziehung aus der Calciumspektrofluorimetrie für PCB 47/NAA im Vergleich zur Kontrolle und Einzelapplikation, sowie Agonisten-Versuche).

Möglicherweise kommen bei der gemeinsamen Applikation von NAA und PCB 47 aber auch noch andere zelluläre Parameter zum Tragen, die hier noch nicht erfasst wurden und letztlich zum Zusammenbruch der ATP-Antwortfähigkeit, wie in der Calciumspektrofluorimetrie gezeigt, der Makrophagen führen.

Übersicht über die aus allen Konzentrations-Effektbeziehungen ableitbaren Bindungskonstanten, Bindestellen und Reaktionsenthalpien:

Nach Edsall und Gutfreund 1983 kann man durch die linearisierte Darstellung der Konzentrations-Effektbeziehungen im Scatchardplot die Assoziations- respektive Dissoziationskonstanten, Zahl der Bindungsstellen und die im System aufzuwendende bzw. frei werdende Energie ableiten. Für die Konzentrations-Effektbeziehungen [1 bis 10] nach ATP in der Calciumspektrofluorimetrie (s. Tabelle 5, nächste Seite) wurden der Effekt [maximale zytosolische Calciumerhöhung, Ratio] gegen eingesetzten Agonisten pro maximaler zytosolischer Calciumerhöhung [cATP/ Ratio] zuerst graphisch aufgetragen und im graph-pad-prism-Programm durch lineare Regression angepasst. Der Scatchardplot (Beispiel s. Abbildung 16b, S. 119) liefert als Y-Achsenabschnitt die Zahl der Bindungsstellen für ATP [N], der X-Achsenabschnitt die Zahl der Bindungsstellen \times Assoziationskonstante $[N \times K_a]$ nach.

Die gleiche Transformation der Daten wurde durchgeführt für die zyklischen Nukleotide in Abhängigkeit vom PCB 47 oder iNOS-Inhibitor (N^G -Amino-L-Arginin), und für die Kombination aus beiden sowie für PCB/Forskolin versus cAMP, also auf der X-Achse die Konzentrationen der gemessenen Variable, auf der Y-Achse die Konzentration des eingesetzten Agonisten (Antagonisten)/ Konzentration der gemessenen Variablen.

Es sei an dieser Stelle ausdrücklich darauf hingewiesen, dass diese Form der Darstellung streng nur bei Daten mit gleichen Standardabweichungen gilt, was hier nicht zutrifft und biochemisch eigentlich nur in isolierten Systemen (also aufgereinigten Enzymen mit definierten Konzentrationen eingesetzter Liganden und Enzymmodulatoren) Sinn macht, bei denen das enzymatische Produkt quantifiziert werden kann.

Diese Auftragung liefert aber zusätzlich zu EC_{50} oder IC_{50} und B_{max} oder K_D einer pharmakologischen Betrachtung der Daten auch die biochemischen Parameter der energetischen Wahrscheinlichkeit des Ablaufs dieser Reaktionen.

Der Zusammenhang zwischen appliziertem ATP und der gemessenen Fluoreszenzratio sowie die inkubierte PCB-Konzentration und nachfolgend gemessenen Spiegel freigesetzten Gesamtnitrits oder zyklischer Nukleotide sind keine direkt voneinander abhängigen Variablen, sondern schliessen eine Reihe von Zwischenschritten ein, sind aber gestattet unter der Annahme, dass ein konstanter Zusammenhang zwischen den Messparametern besteht (Edsall und Gutfreund, 1983).

Die Änderung der freien Enthalpie

$$\Delta G = \Delta G^\circ - R T \ln k_A$$

mit ΔG = Änderung der freien Enthalpie, ΔG° = freie Enthalpie unter Standardbedingungen, R = Gaskonstante = 8.31 kJ/Mol K, T = absolute Temperatur in K [Kelvin], = 310K, da bei 37°C gearbeitet wurde und $\ln k_A$ = Logarithmus naturalis der aus den Scatchard-Plots berechneten Assoziationskonstanten ist ein Maß des Anteils an Energie der entsprechenden Reaktionen, der während des Reaktionsablaufes als nutzbringende Arbeit gewonnen werden kann.

Die freie Enthalpie ΔG ist < 0 (negativ) für exergone Reaktionen, die von selbst, ohne Energiezufuhr ablaufen, $\Delta G > 0$ (positiv) für endergone Reaktionen, die nur unter Energiezufuhr in Form von Arbeit ablaufen können und $\Delta G = 0$ bei keiner Reaktion, also im Gleichgewicht.

Da die freie Standardenthalpie ΔG° sich auf Standardbedingungen, also Konzentrationen der Reaktionspartner in 1 molaren Konzentrationen, bezieht, über die tatsächlichen Konzentrationen und über Enthalpie und Entropie aber nichts ausgesagt werden kann, wurden nur die aus der graphischen Darstellung entnehmbaren K_D = Dissoziationskonstanten und N = Zahl der Bindungsstellen angegeben.

		Scatchardanalysen:			Nicht lineare Regression:			
					Hyperbolisch:		Sigmoidal:	
Konzentrations-Effektbeziehung:		Assoziationskonstanten $K_a = 1/K_D [\mu M^{-1}]$:	Dissoziationskonstanten $K_D [\mu M^{-1}]$:	Anzahl Bindungsstellen [N] :	B_{max} - Werte	K_A - Werte	B_{max} - Werte	EC_{50} - Werte [μM]
<u>Calciumspektrofluorimetrie:</u>								
1	Kontrolle	$K_{a1} = 6.5 \times 10^{-2}$ $K_{a2} = 6.65$	$K_{D1} = 15.38$ $K_{D2} = 1.5 \times 10^{-2}$	$N_1 = 523.5$ $N_2 = 175.5$	167.9 164.5	3.281 3.309	332.1	3,73
2	PCB 47	$K_{a1} = 1.59 \times 10^{-3}$ $K_{a2} = 3.57$	$K_{D1} = 628.9$ $K_{D2} = 0.28$	$N_1 = 42010$ $N_2 = 175.5$	4337 4402	47.77 45.17	39880	50,9
3	XAMR	$K_{a1} = 0.273$	$K_{D1} = 3.66$	$N_1 = 290.5$	349.9	17.74	352.2	18,7
4	XAMR/PCB 47	$K_{a1} = 0.11$	$K_{D1} = 9.09$	$N_1 = 3022$	425,6	6,16	412.3	3,35
5	PCB 77	$K_{a1} = 0.33 \times 10^{-2}$	$K_{D1} = 3.3 \times 10^{-3}$	$N_1 = 542.3$	609.2	15.28	668.1	24,9
6	N ^G -Amino-L-Arginin	$K_{a1} = 0.553$	$K_{D1} = 1.81$	$N_1 = 876.2$	1032	9.38	1075	13.14
7	PCB/N ^G -Amino-L-Arginin	$K_{a1} = 0.19$	$K_{D1} = 5.26$	$N_1 = 515.8$	425.6	6.161	426.1	6.34
8	Benzoyl-benzoyl-ATP	$K_{a1} = 30.28$ $K_{a2} = 6 \times 10^{-3}$	$K_{D1} = 3.3 \times 10^{-2}$ $K_{D2} = 166.7$	$N_1 = 36.92$ $N_2 = 803.5$	758.5	138.4	777.4	15.74
9	ATP ohne Calcium	$K_{a1} = 3.38 \times 10^{-3}$	$K_{D1} = 303.25$	$N_1 = 77.45$	303.9	33.52	290.9	28.18
10	ATP ohne Calcium/PCB	$K_{a1} = 1.8 \times 10^{-3}$	$K_{D1} = 544.68$	$N_1 = 70.59$	290.7	29.44	301.0	35.15
11	N ^G -Amino-L-Arginin Abhängigkeit der ATP-Antwort	$K_{a1} = 0.52 \times 10^{-6*}$	$K_{D1} = 1920886$	$N_1 = 4249$	2354.68	14.53	2838	0.738
12	PCB 47- Abhängigkeit der ATP-Antwort	$K_{a1} = 26.5 \times 10^{-6}$	$K_{D1} = 37731$	$N_1 = 4558$	641.1	14.72	nd.	nd.
<u>NO-Freisetzungssassays:</u>								
13	PCB inhibierte NO-Freisetzung	$K_{a1} = 0.024$ $K_{a2} = 0.022$	$K_{D1} = 4166.70$ $K_{D2} = 4545.45$	$N_1 = 148.33$ $N_2 = 19.89$	nd.	nd.	47.42	0.081

Tabelle 5: Scatchard-Analysen und Vergleich der Modelle für nichtlineare Regression der verschiedenen ermittelten Konzentrations-Effektbeziehungen.

		<i>Scatchardanalysen:</i>			<i>Nicht lineare Regression:</i>			
	<u>Assays für zyklische Nukleotide:</u>							
14	cAMP [PCB]	$K_{a1} = 45$ $K_{a2} = 24090$	$K_{D1} = 22.22$ $K_{D2} = 0.04$	$N_1 = 2.3$ $N_2 = 0.01$	nd.	nd.	226.2	0.585
15	cAMP [N^G -Amino-L-Arginin]	$K_{a1} = -129.93$ $K_{a2} = -0.22$	$K_{D1} = -7.7 \times 10^{-4}$ $K_{D2} = 44.23$	$N_1 = 110.6$ $N_2 = -107.7$	nd.	nd.	180	0.39
16	cAMP [PCB/Forskolin]	$K_{a1} = 68.4$ $K_{a2} = 20480$	$K_{D1} = 14.62$ $K_{D2} = 0.05$	$N_1 = 2.3$ $N_2 = 0.01$	nd.	nd.	202.9	0.365
17	cGMP [PCB]	$K_{a1} = -3.69$	$K_{D1} = -0.271$	$N_1 = 25.92$	nd.	nd.	69.1	1.8×10^{-3}
18	cGMP [N^G -Amino-L-Arginin]	$K_{a1} = 34$ $K_{a2} = 2075$	$K_{D1} = 29.4$ $K_{D2} = 0.48$	$N_1 = 2.76$ $N_2 = 0.07$	nd.	nd.	119.0	0.24×10^{-6}
19	cGMP [PCB/ N^G -Amino-L-Arginin]	$K_{a1} = -82.99$	$K_{D1} = -0.012$	$N_1 = 16.87$	nd.	nd.	79.94	1.05×10^{-7}

Tabelle 5 (Fortsetzung): Scatchard-Analysen und Vergleich der Modelle für nichtlineare Regression der verschiedenen ermittelten Konzentrations-Effektbeziehungen. Die Datenpunkte aller Konzentrations-Effektkurven wurden linearisiert für c[ATP]/Calcium versus Calcium für die Calciumspektrofluorimetrieversuche und c[Behandlung]/ c [zyklisches Nukleotid] versus c [zyklisches Nukleotid] für cGMP bzw. cAMP Enzymimmunoassays dargestellt und die Assoziationskonstante K_a aus dem Ordinaten-Abschnitt ($K_a N$) und die Zahl der Bindungsstellen (N) aus dem Abszissenabschnitt (N) errechnet. Die Dissoziationskonstanten wurden errechnet nach $K_a = 1/K_D$, (nach Edsall und Gutfreund, Herausgeber, Kapitel 4 und 5, 1983).

4.2 bovine chromaffine Zellen

4.2.1 Calcium-Spektrofluorimetrie-Experimente zur akuten PCB 47-Wirkung:

Für chromaffine Zellen konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die akute PCB 47-Exposition der Zellen in Calcium-haltigem Na^+ -HBS zu einer spontanen Erhöhung des Calciumspiegels führt, im Gegensatz zu Makrophagen, über Mechanismen an der äußeren Zellmembran und ist PCB-konzentrations-abhängig (Messeri, Bickmeyer und Wiegand, 1997). Für durch erhöhte Kaliumlösung evozierte Depolarisationen bei den chromaffinen Zellen zeigte sich keine veränderte Katecholaminsekretion innerhalb von 5h, wohl aber kongenerenspezifisch für das

Intrazelluläre Calciumerhöhung boviner chromaffiner Zellen nach Kaliumdepolarisation und akuter PCB 47 Applikation

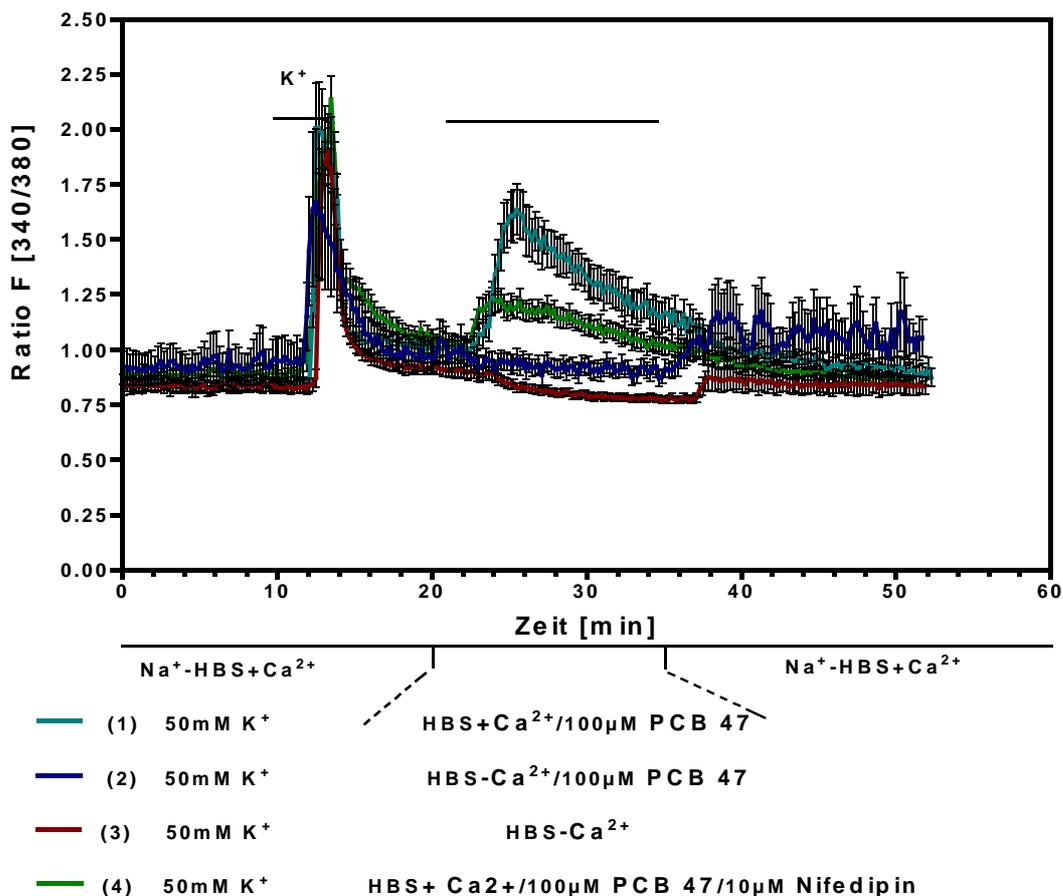


Abbildung 39: Calcium-Spektrofluorimetrie chromaffiner Zellen nach [100µM] PCB 47-Behandlung mit und ohne Calciumentzug. Zur Vitalitätstestung wurden die Ansätze 100 Sekunden mit 50mM K^+ -Ringer depolarisiert. Nach Auswaschen der Kaliumlösung wurden die Zellen PCB 47 exponiert (1), mit calciumfreiem Ringer und 100µM PCB (2) und nur mit calciumfreien HBS-Ringer (3) superfundiert. In Spur (4) wurde gleichzeitig mit dem PCB 47 in Calcium-haltigen Ringer der Blocker spannungsgesteuerter L-Typ-Calciumkanäle, [10µM] Nifedipin appliziert. Alle Spuren: Mittelwerte von $N \geq 6$ Zellen, sem. Alle Zellen, die nach Kaliumdepolarisation mit einer Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels reagierten, wurden in die Auswertung einbezogen. CSF

ortho-chlorierte PCB 47 eine Verringerung nach 24h und 5 Tagen ab etwa 50µM, nicht aber für das

koplanare PCB 77 (Messeri et al. II, 1997). Nach Versuchsreihen in unserer Arbeitsgruppe ist der Spontanrelease von Adrenalin und Noradrenalin innerhalb von 5 Stunden PCB 47-Exposition deutlich erhöht, und erfolgt überwiegend innerhalb der ersten 30 Expositionsminuten (Wiegand, nicht veröffentlichte Beobachtungen).

Wie von Messeri et al.(1997 I) gezeigt werden konnte, ist eine in der Calciumspektrofluorimetrie durch akute PCB 47-Applikation ausgelöste intrazelluläre Calciumerhöhung abhängig von der applizierten PCB 47-Konzentration.

In Anwesenheit von Calcium zeigt sich innerhalb weniger Minuten nach PCB 47-Applikation ein steiler intrazellulärer Calciumanstieg, der über etwa 20 Minuten erhalten bleibt, aber bereits innerhalb der ersten zwei Minuten ein Maximum erreicht (hellblaue Spur, '1').

Entzieht man den chromaffinen Zellen in der Calcium-Spektrofluorimetrie während der PCB-Inkubation das Calcium extrazellulär, fehlt der Anstieg des zytosolischen Calciumlevels völlig (rote Spur, '3'), lediglich nach Rekonstitution des extrazellulären Puffers ist der folgende Calciumeinstrom deutlich gestört (dunkelblaue Spur, '2') und oszillierend.

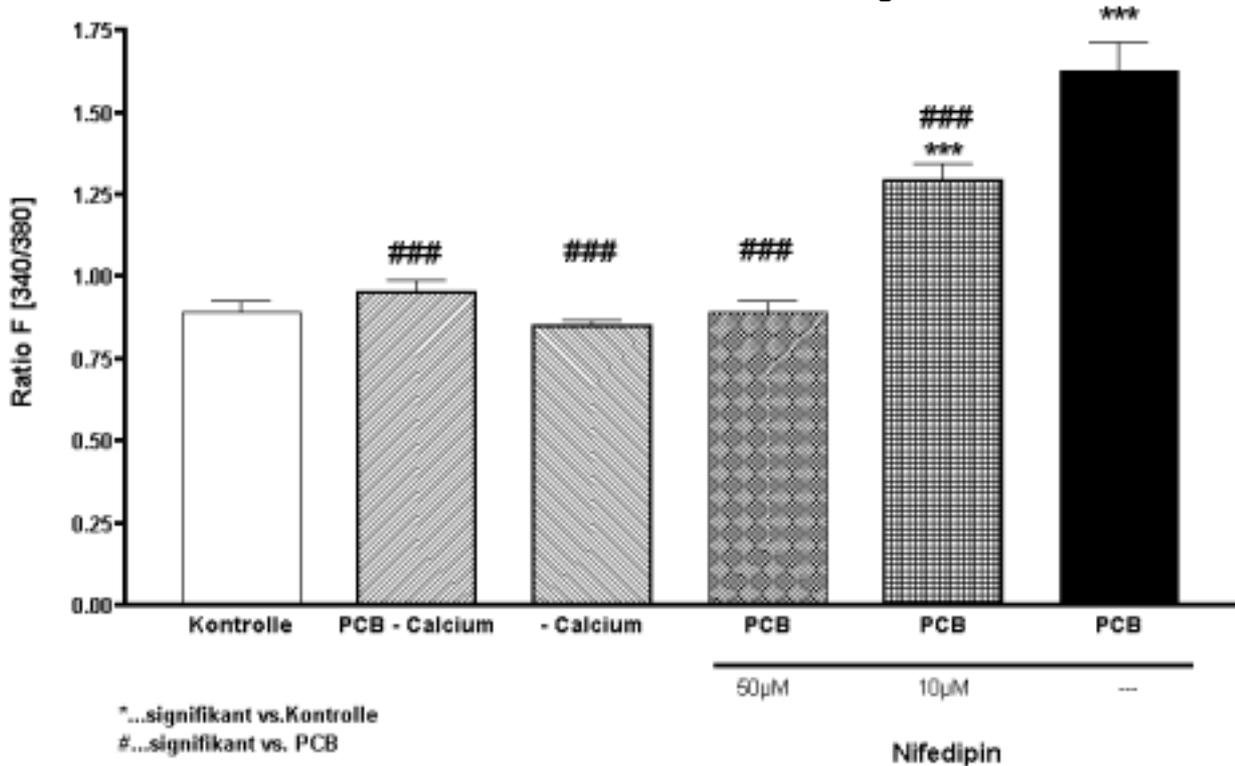
Nach Kaliumdepolarisation und nachfolgend Na^+ -HBS oder 0.1% DMSO zeigt sich keine Veränderung der basalen Calciumwerte (Daten nicht gezeigt). Eine akute PCB-Exposition führt zu einer spontanen Elevation des zytosolischen Calciumlevels. Diese erfordert, wie die Calciumentzugsexperimente zeigen, die Anwesenheit extrazellulären Calciums. Fehlt dieses (Ansätze 2 und 3), ist kein zytosolischer Calciumanstieg feststellbar, etwa aus intrazellulären Speichern. Das bedeutet, dass bei bovinen chromaffinen Zellen mit einiger Wahrscheinlichkeit (a) weder zytosolische Calciumsequestrierpumpen akut durch das PCB gehemmt werden und es zu einen Nettoausstrom aus den Speichern ins Cytosol kommt, noch dass (b) Ryanodin- oder IP_3 -Rezeptoren das Target des PCBs sind und zu einer intrazellulären Calcium-Mobilisierung auf diese Weise führen.

Der durch das PCB 47 [100 μM] ausgelöste Calciumeinstrom ist spezifisch mit Nifedipin [10 μM] zu blocken (grüne Spur, '4'). Ein totaler Block der PCB-induzierten Calciumerhöhung ergibt sich in Anwesenheit von 50 μM Nifedipin (nicht gezeigt).

Dieser ist signifikant gegenüber PCB alleine und gegenüber 10 μM Nifedipin. Dieser PCB-induzierte Einstrom ist also *dosisabhängig* durch *Nifedipin blockierbar*.

Das bedeutet, PCB 47 führt zu einem Calciumeinstrom an spannungsgesteuerten L-Typ-Calciumkanälen auf den chromaffinen Zellen, für die Nifedipin ein gängiger pharmakologisch bedeutsamer Antagonist ist.

PCB 47 induzierte maximale Calciumerhöhungen



Behandlung

Abbildung 40: Maximale Amplitude der PCB-verursachten Calciumerhöhungen (3 bis 6 Minuten nach Applikation des PCB oder Calciumzug). Die angegebenen Signifikanzen bedeuten $p < 0.001$, * = signifikant versus Kontrolle, # = signifikant versus 100µM PCB-Applikation. CSF

Zum statistischen Vergleich wurden die maximalen Amplituden der Calcium-Änderungen in den verschiedenen Ansätzen einer einseitigen Anova-Varianzanalyse unterzogen.

Gegenüber der Kontrolle sind die Calciumzugexperimente mit und ohne PCB nicht signifikant verschieden.

Die PCB 47-Behandlung allein ist mit $p < 0.01$ hochsignifikant verschieden von der Kontrolle und, was wesentlich ist, vom PCB-Ansatz im calciumfreien Ringer. Das bedeutet, extrazelluläres Calcium wird für die PCB-induzierte Erhöhung des Spiegels benötigt. Für PCB 47 in Anwesenheit von 10µM Nifedipin erfolgt eine drastische Verringerung des induzierbaren Einstroms (### = $p < 0.01$ vs. PCB alleine), für 100µM PCB in Anwesenheit von 50µM Nifedipin wird die Antwort auf die Basallinie geblockt (### = $p < 0.001$ vs. PCB und PCB/10µM Nifedipin). Das bedeutet, die PCB-Aktion ist durch den spezifischen L-Typ-Calciumantagonisten Nifedipin *spezifisch* konzentrationsabhängig zu blocken.

4.2.2 Beeinflussung der Spannungsabhängigkeit von Calciumleitfähigkeiten in der Extrazellulärmembran

a) whole-cell-Ableitungen und Spannungsänderungen nach akuter PCB-Zugabe

Da sich nach den Calciumspektrofluorimetrieexperimenten eine PCB-abhängige intrazelluläre Calciumerhöhung zeigt, die von extrazellulärem Calcium abhängig ist und durch Nifedipin, einen L-Typ-Kanal-Calciumantagonisten spezifisch zu blockieren ist, wurden nachfolgend die elektrophysiologischen Eigenschaften der chromaffinen Zellen studiert.

Dazu wurden die Zellen im 'whole-cell'-Modus gehalten und PCB akut appliziert, oder PCB 47 wurde direkt nach intrazellulär über die Patchelektrode appliziert. Durch geeignete Wahl einer entsprechenden Badlösung wurden Bariumionenströme durch Calciumkanäle gemessen.

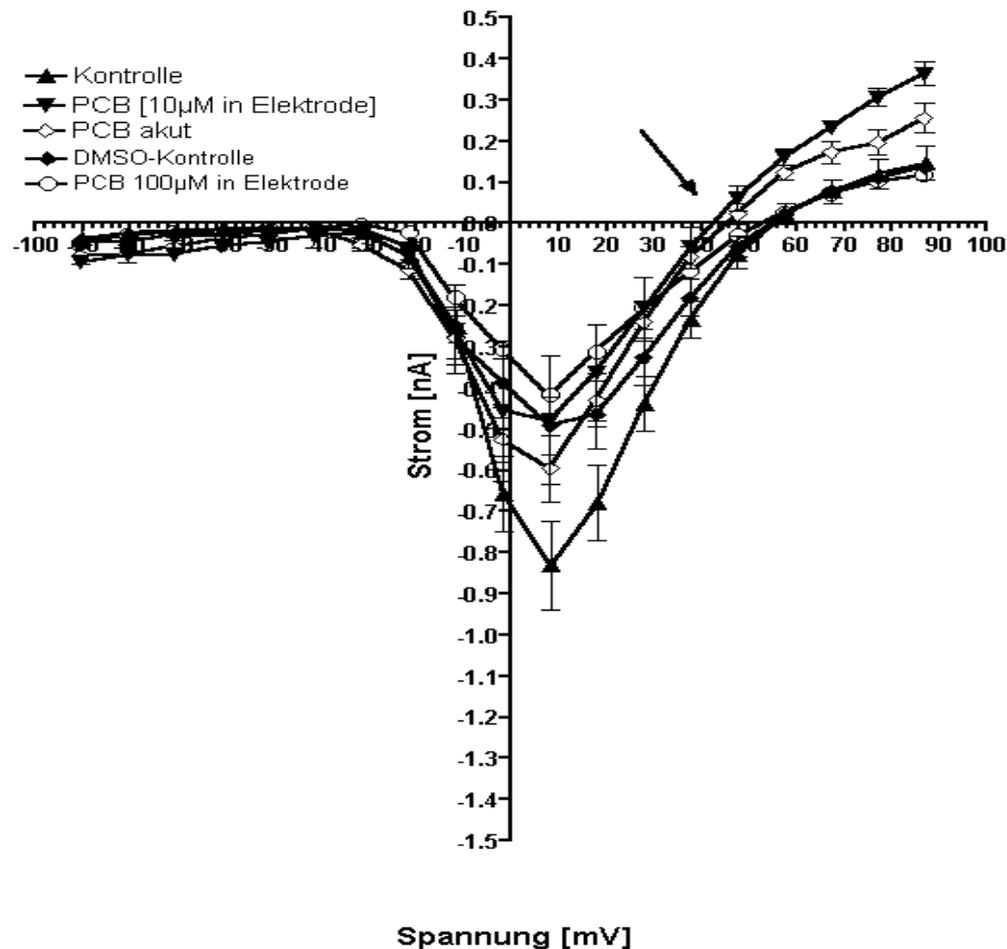


Abbildung 41a : Strom-Spannungskurven boviner chromaffiner Zellen im 'whole-cell'-Modus. Unbehandelte Kontrollen, akut mit 0.1% DMSO, oder 10- bzw. 100µM PCB 47 in der Patchelektrode. Die Abbildung zeigt Bariumeinwärtsströme bei einem Haltepotential von -60mV und Spannungsschritten von 10mV, bis nach minimal -100 und bis maximal +100mV. Die Zellen wurden entweder nicht (Kontrolle), akut mit 100µM PCB (PCB akut), 5h mit PCB 47 [100µM] (5h PCB), einen Tag mit 100µM (24h PCB 47) oder akut in der Elektrode (10µM PCB in Elektrode) behandelt und anschließend die Strom-Spannungskurven für $N \geq 3$ aufgezeichnet. *PC*

Diese weisen eine gute Permeabilität für Barium auf und liefern ein größeres Signal sowie somit ein besseres Signal/Rauschverhältnis der Detektion.

Chromaffine Zellen wurden im whole-cell-Modus gehalten und die Bariumströme durch Calciumkanäle nach Spannungssprüngen aufgezeichnet, alle anderen Kanalqualitäten waren durch Tetrodotoxin (Natriumleitfähigkeiten) oder Tetraethylammoniumchlorid/Cäsiumchlorid (Kaliumleitfähigkeiten) blockiert.

In den patch-clamp-Experimenten (s. dort) zeigt sich eine Veränderung des Membranpotentials nach akuter PCB-Applikation bis 15 Minuten nach Applikation. Die Amplitude der Spannungsänderungs-evozierten Calcium-Einwärtsströme ist durch das PCB signifikant verringert.

Barium ist als kleineres Ion permeabler für Calciumkanäle, die mitunter schwer detektierbar sind. Für andere Kanalqualitäten ist dieses Ion praktisch impermeabel.

Die Strom-Spannungskurve der Kontrolle zeigt einen aktivierenden Einwärtsstrom bei einem Schritt von -60mV auf -20mV , beginnend ab etwa -25mV . Dieser erreicht sein Maximum mit $dI = 0,83 \pm 0,106 \text{ nA}$ bei $+10\text{mV}$ und hat ein Umkehrpotential von $+55\text{mV}$. Der Pfeil in der Abbildung markiert das für die einzelnen Behandlungen unterschiedliche Umkehrpotential.

Demgegenüber zeigen 0.1% DMSO und akut $100\mu\text{M}$ PCB vorbehandelte Zellen die gleiche Aktivierung, sind aber in ihrer maximalen Amplitude signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert. Im DMSO-Ansatz ist das Umkehrpotential nicht verändert, dafür aber im Ansatz mit PCB-Applikation nach Erreichen der 'whole-cell'-Konfiguration ('PCB akut') und nach $10\mu\text{M}$ PCB in der Elektrode (siehe Pfeil in Abbildung 2a).

Das bedeutet, bereits akute PCB-Zugabe führt zu einer veränderten Ionenverteilung zwischen Zellinnerem und Extrazellulärraum, die nicht auf das DMSO zurückzuführen ist. Mit einiger Wahrscheinlichkeit handelt es sich hierbei um Natriumionen, da das Umkehrpotential für Natrium bei etwa $+55\text{mV}$ liegt, da Natriumleitfähigkeiten ansich durch Tetrodotoxin blockiert sind, aber Calciumleitfähigkeiten auch eine partielle Permeabilität für andere Kationen aufweisen können. Die Vermutung liegt nahe, dass ein Calcium/Natriumtransporter der äußeren Zellmembran durch das PCB partiell blockiert wird, der Leckströme des Natriumions über der Zellmembran kompensiert. Die Maximalamplitude der Strom-Spannungskurven nach PCB ist zwar reduziert, aber diese Reduktion ist auf das DMSO zurückzuführen.

Bereits 0.1% DMSO genügen, um die maximale Leitfähigkeit der Ionenkanäle für Barium partiell zu verändern.

Die Verringerung des Umkehrpotentials ist reversibel, denn, wie Abbildung 42b zeigt, ist nach fünf Stunden PCB-Vorinkubation das Umkehrpotential wieder bei $+55\text{mV}$. Die Zellen sind wohl in der Lage, die wesentliche Eigenschaft aufrecht zu erhalten. Ob es sich bei den gezeigten Effekten um eine direkte Beeinflussung eines Transporter handelt, oder um einen sekundären, energieabhängigen Prozess (also eine Inhibition der ATP-Synthase und damit eine Verschiebung

des ADP/ATP-Quotienten in den Zellen, kann hier nicht geklärt werden.

Nach 5 Stunden PCB-Vorinkubation unterscheiden sich die Strom-Spannungskurven der Zellen nicht von denen der Kontrollen, und auch die Aktivierungsspannung und das Umkehrpotential sind nicht signifikant verschieden voneinander. Offensichtlich ist aber tendenziell das Maximum der Stromamplitude erhöht. Das kann bedeuten, dass die spannungsabhängigen Ionenkanäle in ihrer Funktion verändert sind. Außerdem müsste eine veränderte Expression dieser Ionenleitfähigkeiten weiter verfolgt werden, was einen direkten oder sekundären genetischen Effekt des PCBs bedeutete, wie auch schon bei Makrophagen für P2X₇-Kanäle beobachtet (s. Abbildung 34).

Dadurch kann nach Spannungs-abhängiger Aktivierung der Gesamtstrom über der Zellmembran zunehmen, und nichts anderes wurde hier betrachtet.

b) subchronische PCB-Exposition über 5 Stunden:

Nach 5h PCB 47 zeigt sich kein Unterschied zwischen der Kontrollkurve und den PCB 47-behandelten Zellen. Nach 24h PCB-Inkubation kommen die spannungsevozierbaren Ionenströme nahezu vollständig zum Erliegen. Sowohl hinsichtlich der Aktivierung als auch in Bezug auf das Umkehrpotential sind Kontrollen und 5h PCB-Ansätze nicht verschieden.

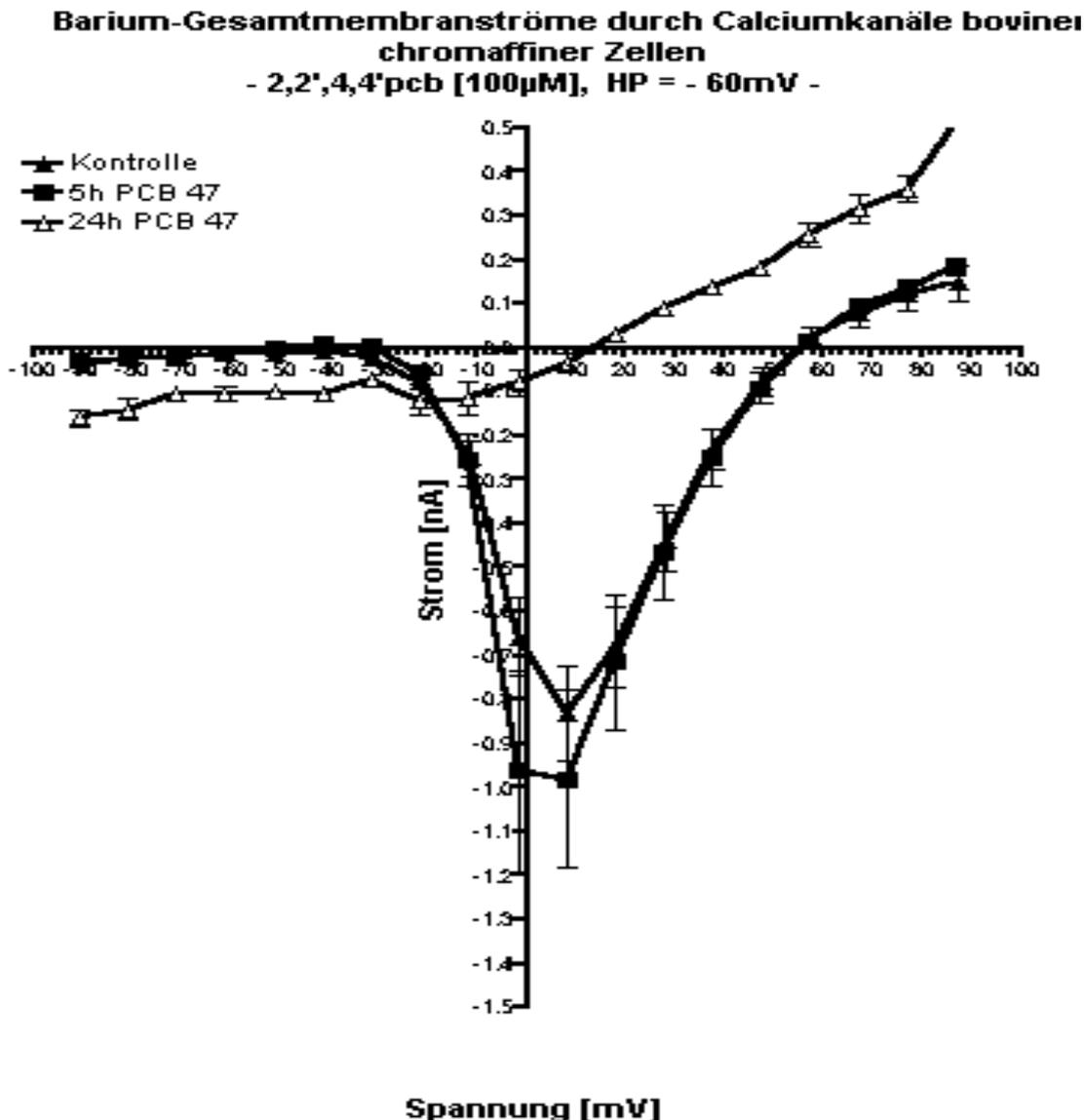


Abbildung 41b: Whole-cell-Gesamtmembranströme boviner chromaffiner Zellen für Kontrolle und 5h PCB 47 [100µM] Vorinkubation. Die Strom-Spannungskurven sind Bariumströme durch Calciumkanäle. Die experimentelle Überprüfung der Stromqualität erfolgte mit 10µM Cadmiumchlorid, das die spannungsabhängigen Einströme hemmt (Daten nicht gezeigt).PC

Im Vergleich zur Kontrolle ist nach fünf Stunden PCB-Vorbehandlung die Amplitude der Strom-Spannungskurve stärker, bei allen anderen Behandlungen deutlich reduziert, bis schließlich nach 24h die Ionenleitfähigkeiten praktisch nicht mehr messbar sind, da die Membranstabilität reduziert ist und vernünftige Gigaseals kaum mehr zu erzielen sind.

Bei etwa -35mV ist die Aktivierungsschwelle für den Einwärtsstrom, der sein Maximum bei etwa $+10\text{mV}$ erreicht und ein Umkehrpotential bei $+55\text{mV}$ für Kontrolle und fünf Stunden PCB 47, sowie $+40$ bis 45 mV für PCB akut und in der Elektrode applizierte $10\mu\text{M}$ PCB47. Nach einem Tag Vorinkubation sind die Membraneigenschaften fast nur noch passiver Natur. Für die intrazelluläre PCB-Applikation über die Elektrode wurde eine etwas geringere PCB-Konzentration, $10\mu\text{M}$ gewählt. Die Membranströme nach Erreichen der whole-cell-Konfiguration entwickeln sich erst nach etwa fünf Minuten vollständig, da es etwas dauert, bis Kaliumleitfähigkeiten durch Cäsium- und Tetraethylammoniumchlorid und Natrium-Leitfähigkeiten durch Tetrodotoxin blockiert sind, so dass nur die Calciumleitfähigkeiten übrig bleiben.

Zum Beleg, dass die hier studierten Ströme von Calciumleitfähigkeiten getragen werden, wurde zu Versuchsende $10\mu\text{M}$ Cadmiumchlorid appliziert, was die Ströme vollständig hemmte (nicht gezeigt). Das bedeutet, nach fünf Stunden Vorinkubation sind die in den akuten Ansätzen beobachteten Effekte durch das PCB an Stelle einer zellulären Kompensation, und nach 24 Stunden Inkubation einer allgemeinen Membranschädigung zurückgetreten.

Vergleicht man die maximalen Amplituden der Einwärtsströme über one-way-Anova, sind 5h PCB gegenüber der Kontrolle signifikant (*, $p < 0.05$), alle anderen Ansätze mit $p < 0.001$ hochsignifikant (***) verschieden:

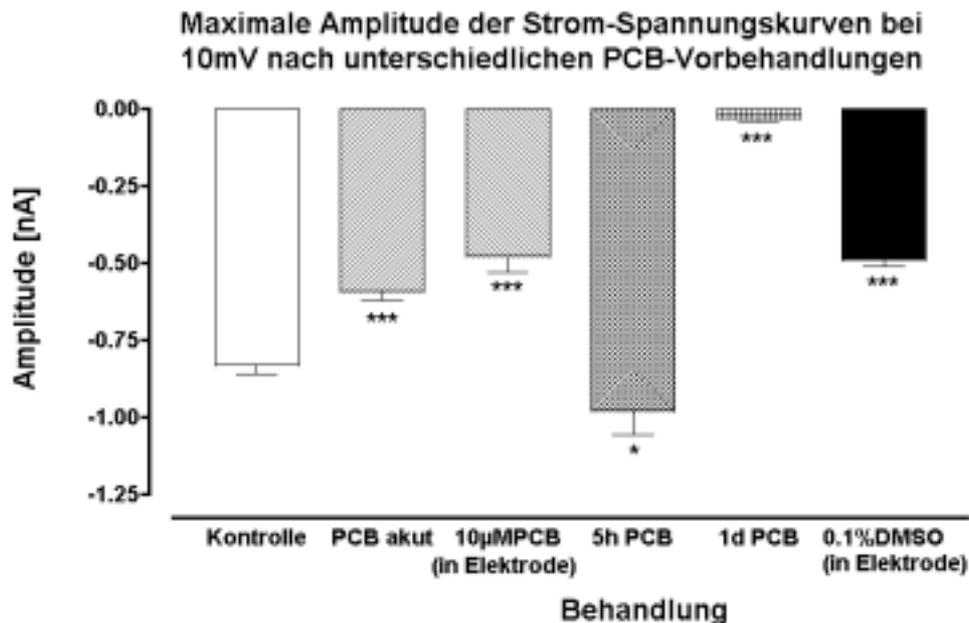


Abbildung 41c: Maximale Amplituden der Strom-Spannungskurven in 2a und 2b. Jeweils die peak-Werte der Strom-Spannungskurven wurden im Einseitigen-Anova-Test und Neumann-Keuls -Post-Test miteinander verglichen. Werte für * = $p < 0.05$, signifikant, *** = $p < 0.01$ hochsignifikant verschieden. PC

Bis auf die 5 Stunden 100µM PCB-Vorinkubationsansätze, die gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht sind, ist bei allen anderen Behandlungen der Zellen diese hochsignifikant verringert. Da bereits 0.1% DMSO in der Patchelektrode die Amplitude der Stromspannungskurven deutlich verringert, können die nach PCB [10µM] bzw. [100µM] in der patch-Elektrode akuten Reduktionen nicht definitiv darauf zurückgeführt werden. Zu den akut-PCB-Ansätzen in der Elektrode ist noch zu bemerken, dass eigentlich kein Hinweis dafür vorliegt, dass die beobachteten PCB-Effekte bei den chromaffinen Zellen auf eine Veränderung von Rezeptorqualitäten von intrazellulärer Seite zurückzuführen sind.

Die fünf-stündige Vorinkubation des PCBs führt zu einer signifikant erhöhten Stromamplitude versus akut-Kontrolle. DMSO [0.1%] über fünf Stunden hat keinen signifikanten Effekt auf die Amplituden der Strom-Spannungskurven (Daten nicht gezeigt).

Möglicherweise ist dies auf einen kompensatorischen Effekt der Zellen auf die Aktion des PCB an den L-Typ-Calciumkanälen zurückzuführen.

Um dies weiterzuverfolgen, müssten alle anderen Subklassen an Ionenleitfähigkeiten geblockt werden (T-Typ- und N-Typ, sowie die nichtselektiven und nicht-spannungsgeregelten) und ausschließlich einzelne Subklassen dieser Qualität betrachtet werden. Dies wurde aber nicht weiter verfolgt.

c) Membranpotentiale in akuten und subchronischen PCB-Ansätzen und entsprechenden Kontrollen

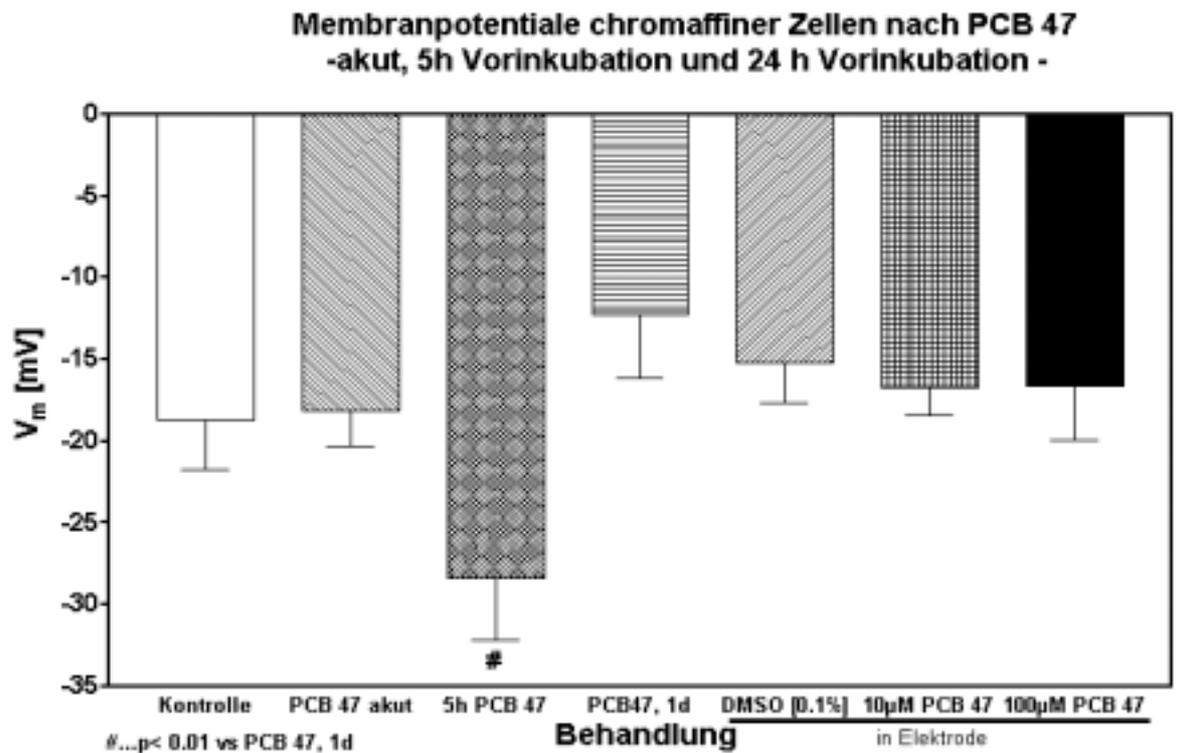


Abbildung 41d: Membranpotentiale der in 2a bis c gezeigten Ansätze. Nach Erreichen der whole-cell Konfiguration wurde nach 5 Minuten im Äquilibrium das Membranpotential bestimmt (durch Umschalten von Spannungs- auf Stromklemme). PC

Die Membranpotentiale der verschiedenen Ansätze sind in keinem Fall signifikant verschieden von der Kontrolle. Einzig nach 5h Stunden PCB-Vorbehandlung gemessene Membranpotential unterscheidet sich hochsignifikant ($p < 0.01$) vom 24h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Ansatz. Tendenziell entsprechen diese den abgeleiteten Strom-Spannungskurven in 1a bzw. 1b. Das macht insofern Sinn, da eine Ionengleichgewichtsverschiebung-bedingte Änderung des Membranpotentials auch eine andere Dynamik der Ionenströme erwarten läßt.

d) typische Ableitung von N = 4 chromaffinen Zellen im Spannungsklemmodus nach akuter

PCB-Zugabe:

Der Zeitverlauf der in der Calciumspektrofluorimetrie beobachteten intrazellulären Calciumerhöhung wurden nachfolgend in der 'whole-cell'-Konfiguration für Bariumströme durch Calciumkanäle überprüft.

Dazu wurden die Zellen bei einem Haltepotential von -60mV gehalten, ohne dass ein Stromreiz appliziert wurde und mit einer Frequenz von 3kHz aufgezeichnet wurde.

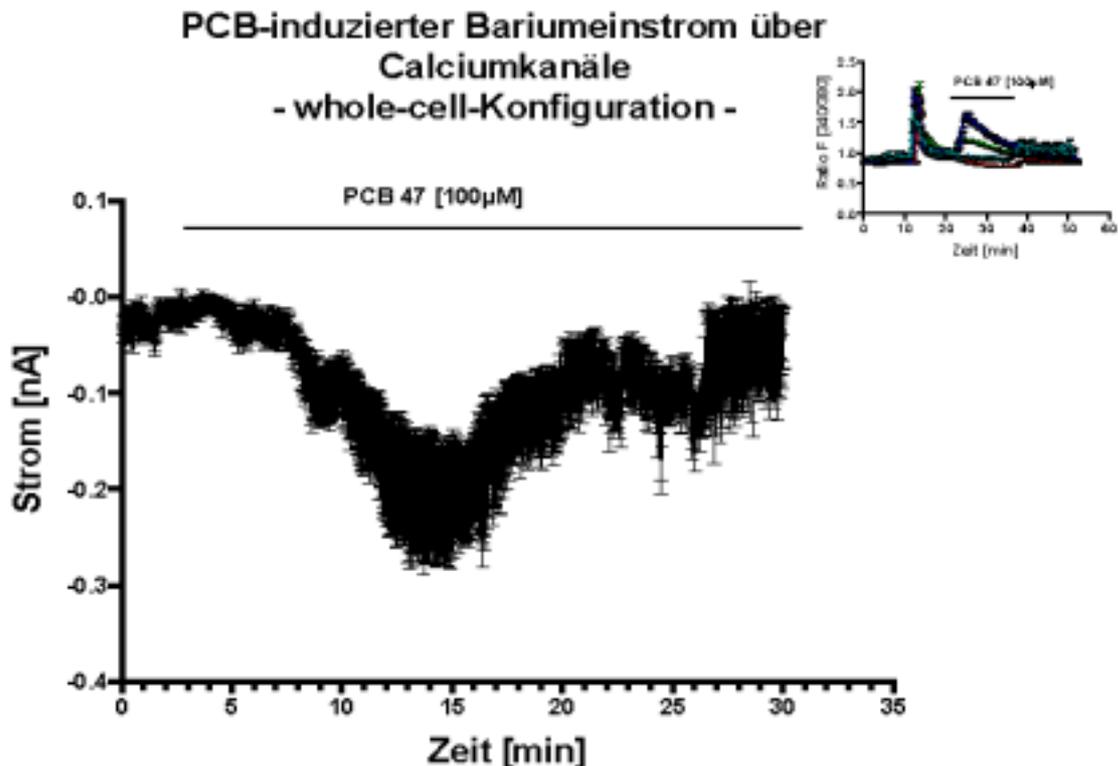


Abbildung 41e: PCB [100µM] induzierter Bariumstrom über Calciumkanäle. Im whole-cell-Modus zeigt sich mit einer ähnlichen Aktivierung und Zeitverlauf (wie im Calcium-Imaging, s. Insertionsgrafik) ein von Bariumionen getragener Einwärtsstrom bei einem Haltepotential von -60mV nach PCB-Applikation. Chromaffine Zellen wurden im whole-cell-Modus mit CsCl₂ und Tetra-Ethyl-Ammonium-Hydroxyd, TEA-OH in der Elektrode zum Block der Kaliumströme ('Pipettenlösung 4a') und CsCl₂ (zum Block der Kalium-) und Tetrodotoxin, TTX zum Block der Natriumströme ('Badlösung A') mit Barium als einzigem permeablen Ion gehalten. Etwa drei Minuten nach Erreichen der whole-cell-Konfiguration wurde mit der Aufzeichnung begonnen und 75 Sekunden später PCB 47 [100µM] appliziert. PC

Andere prominente Leitfähigkeiten, wie Kaliumkanäle und Natriumkanäle, wurden durch Wahl entsprechender Bad- und Elektrodenlösungen TTX blockiert.

Der Zeitverlauf in Abbildung (2 e) entspricht dem der Insertionsgrafik aus Calciumspektrofluorimetrie-Experimenten mit PCB-Applikation [100µM] in Anwesenheit extrazellulären Calciums. Beginnend etwa 5 Minuten nach PCB-Applikation erreicht der Einstrom 8 Minuten nach Applikation ein Maximum, kann aber von der Zelle kompensiert werden, obwohl das

PCB nicht aus der Lösung ausgewaschen wurde. Insgesamt hält die PCB-Aktion an den Zellen in etwa 20 Minuten an, was dramatische Veränderungen der Calciumeinstrom-Sekretionskopplung bedeutet.

Die akute PCB-Applikation bei chromaffinen Zellen führt zu einem Einstrom positiver Ladungen, im vorliegenden Fall Barium. Um das experimentell zu beweisen, wurden die Zellen bei einem Haltepotential von -60mV durch Anlegen einer Spannungsrampe nach -160mV hyperpolarisiert, die Rampe bis auf $+40\text{mV}$ gefahren und wieder auf das Haltepotential gebracht. Die Spannungsrampe hat den Vorteil, dass man einerseits an den Zellen ein Spannungsspektrum anlegen kann, mit einer Frequenz von einem Reiz pro Sekunde (1 Hz), aber gleichzeitig nach PCB-Applikation sich entwickelnde Einwärtsströme detektiert werden können. Die Depolarisierung der Spannungsrampe reicht bereits aus, um bei -40mV zu einem spannungsabhängigen Bariumeinstrom zu führen, der Cadmium-sensitiv ist (Daten nicht gezeigt).

Der spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanal ist, wie die Experimente der Strom-Spannungskurven zeigen, (1) intrazellulär durch das PCB *nicht* beeinflusst. (2) ist die *Spannungsabhängigkeit* des Proteins nicht verändert, also Aktivierungsschwelle, Amplitude und Umkehrpotential der Ströme, was wahrscheinlich diejenigen Proteinkomponenten betrifft, die eine Kationenbindungs-abhängige Konfiguration einnehmen. (3) zeigt sich erstaunlicherweise auch keine Veränderung im gemessenen Membranpotential. Die DMSO-Konzentration in der Patchelektrode ist mit 0.1% etwas hoch gewählt.

4.2.3 Einzelkanal-Ableitungen nach subchronischer PCB-Applikation

Bei subchronischer PCB 47-Exposition der chromaffinen Zellen über fünf Stunden ist die Spannungsabhängigkeit, das heisst die Aktivierung, die maximale Stromamplitude und das Umkehrpotential, der Calciumleitfähigkeiten unbeeinflusst. Dennoch zeigen die Zellen einen erhöhten Spontanrelease von Katecholaminen (Messerli et al., 1997). Da nichtevozierte, spontane Catecholaminfreisetzungsvorgänge als von Calciumströmen unabhängig betrachtet werden (s. Diskussion), somit Signalübertragungswege und calciumunabhängige Beeinflussung des Zellphysiologiegefüges zu berücksichtigen sind, wurden diese nachfolgend betrachtet. Da die Spannungsabhängigkeit der Calciumionenkanäle PCB unbeeinflusst ist, wurden die Spontanöffnungsraten und Offenzeiten von Calciumkanälen auf der Ebene von Einzelkanälen studiert. Da sich bei Humanmakrophagen bei einem Zeitraum von fünf Stunden PCB 47-Inkubation eine veränderte Funktion der Stickstoffoxydsynthase gezeigt hat, die auch bei neuronalen Freisetzungsvorgängen und der Langzeitpotenzierung eine entscheidende Rolle spielt (s. Haas, et al., 1997), wurde die Funktion der neuronalen Stickstoffoxydsynthase gleichfalls betrachtet.

a) Veränderung der Membranpotentiale durch PCB 47 und den n-NOS-Inhibitor NPA:

Nach akuter PCB-Exposition zeigt sich in den oben aufgeführten Ansätzen eine deutliche Reduktion der maximalen Amplitude der Strom-Spannungskurven, die nach fünf Stunden PCB-Inkubation aber oberhalb der Kontrollen liegt und ein PCB-induzierter Calciumeinstrom.

Im Vergleich zu den in Abbildung 2 gezeigten Membranpotentialen der chromaffinen Zellen ist nach 5h PCB- in den hier gezeigten Behandlungen das Membranpotential signifikant gegenüber Kontrolle und NPA-Vorbehandlung reduziert. Dabei darf der Hinweis nicht fehlen, dass ein anderer Versuchspuffer verwendet wurde und die Ableitungen nicht im 'whole-cell-Modus' sondern unter 'cell-attached-Bedingungen' erfolgten, das heißt, keine genauen Werte des Membranpotentials darstellen.

Im Unterschied zu den in (2a) gezeigten Strom-Spannungskurven, bei denen selektiv Natrium- (durch TTX) und Kaliumströme (durch Tetraethylammoniumhydroxyd bzw. CsCl₂) inhibiert waren, waren bei den cell-attached-Versuchen (3) nur die Kalium-Ionenströme unter der Elektrode durch CsCl₂ blockiert und der

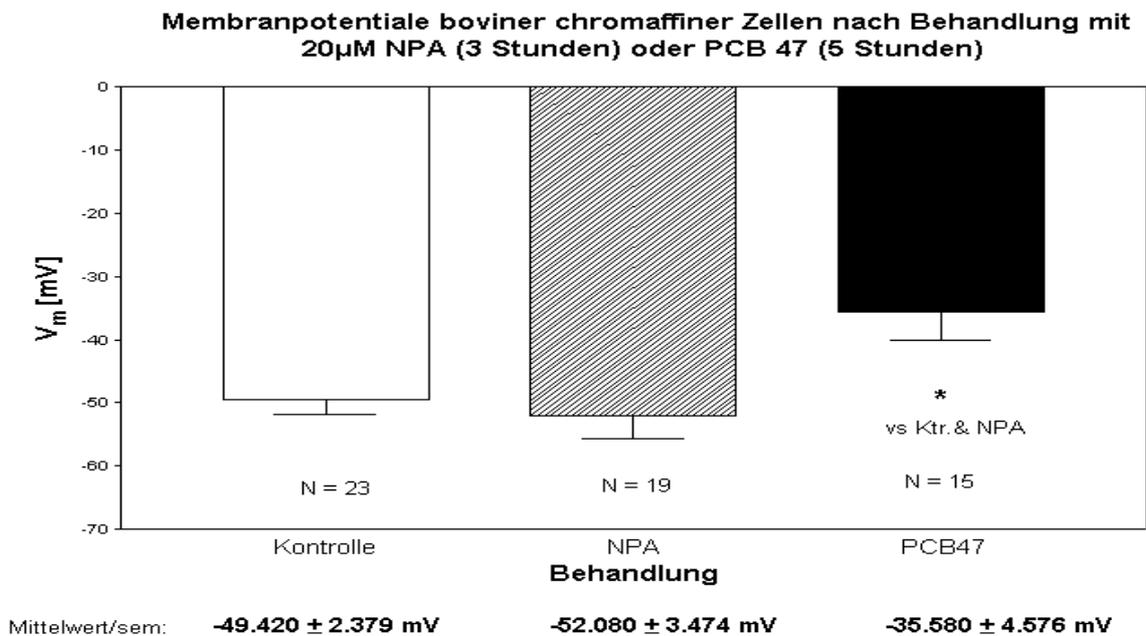


Abbildung 42a: Membranpotentiale für Kontrollen, 3h [20µM] NPA oder 5h [20µM] PCB 47 vorbehandelte bovine chromaffine Zellen. *PC*

Calciumgehalt in der Elektrode war im Vergleich zur oben verwendeten Lösung 10-fach (10 mM statt 1.2mM) erhöht.

Dadurch ist einerseits das Membranpotential in den Cell-attached-Ansätzen bei negativeren Werten, andererseits wird dadurch deutlich, dass nicht nur Calcium-Leitfähigkeiten der Zellen betroffen sein können.

In subchronischen Experimenten zeigt sich zusätzlich zum akut durch PCB ausgelösten Calciueinstrom eine deutlich gesteigerte Katecholaminsekretion (Messerli et al. 1997).

Die Überlegung war nun, nach 5 Stunden nach PCB-Applikation im cell-attached Modus der patch-clamp-Methode die nichtevozierten, spontanen Calciumströme an Einzelkanälen in die Zellen zu studieren.

Der cell-attached-Modus wurde deshalb gewählt, um sekundäre regulatorische Proteine und Strukturen zu erhalten und nicht aus dem zellulären Milieu auszuwaschen. Perforated patch-Analysen (mit Nystatin) wurden nicht durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen in drei Versuchsgruppen eingeteilt:

(1) unbehandelte Kontrollen

(2) 5h PCB-exponierte Zellen

(3) mit 20 μ M 3h e/n-NOS-Inhibitor behandelte Zellen,

letzteres, um möglicherweise eine erste mechanistische Aussage über modulatorische Mechanismen an Einzelkanälen treffen zu können.

Für $N \geq 15$ Zellen lagen die Membranpotentiale in den Kontrollen bei -49.42 ± 2.42 mV und dem NOS-Inhibitor bei -53.08 ± 3.47 mV nicht signifikant verschieden.

Anders jedoch bei den PCB 47 vorbehandelten Zellen: dort ist das Membranpotential signifikant gegenüber Kontrolle und NOS-Inhibitor vorbehandelten Zellen auf -35.58 ± 4.58 mV reduziert, was wiederum für eine Veränderung der Ionenkonzentrationen zwischen Intrazellulärraum und Extrazellulärmedium spricht, die aber unabhängig von etwaigen modulatorischen Einflüssen der Stickstoffoxydsynthase an beteiligten Transportern ist.

b) Änderungen der Spontanfrequenzen der Einzelkanalöffnungen nach PCB 47 und NPA

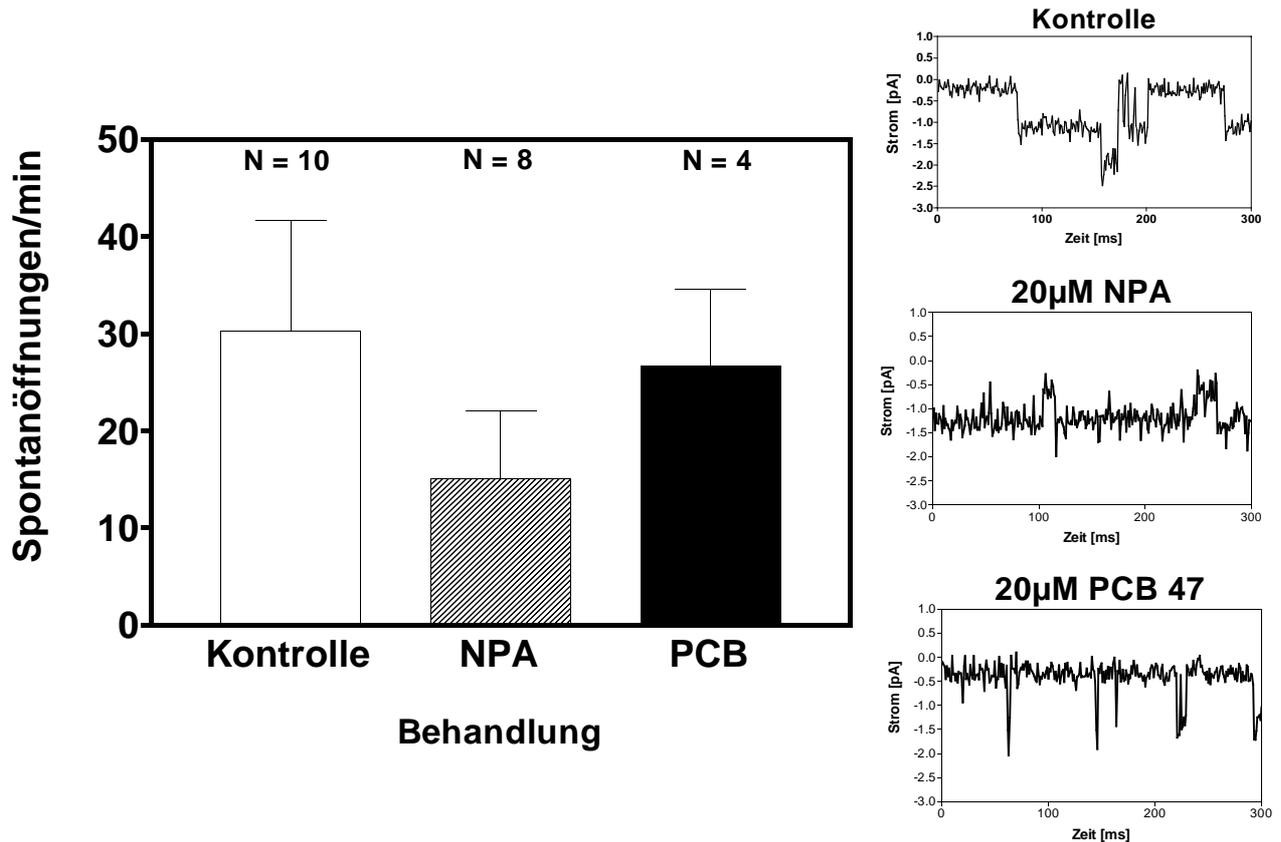


Abbildung 42b: Spontanöffnungsrate von Einzelkanälen in Kontrollen, 3h [20µM] NPA oder 5h [100µM] PCB vorbehandelten bovinen chromaffinen Zellen. Seitlich davon sind jeweils ein Beispiel für (von oben) Kontrolle, NPA und PCB dargestellt. Vorallem fällt auf, dass in den PCB-behandelten Ansätzen die Frequenz schneller Öffnungen ansteigt. Auswertung einschließlich Offendauer siehe nachfolgende Abbildungen. *PC*

Für Kontrolle, 1.5h 20 μ M NPA und 5h 20 μ M PCB vorbehandelte Zellen ergeben sich folgende Offenwahrscheinlichkeiten:

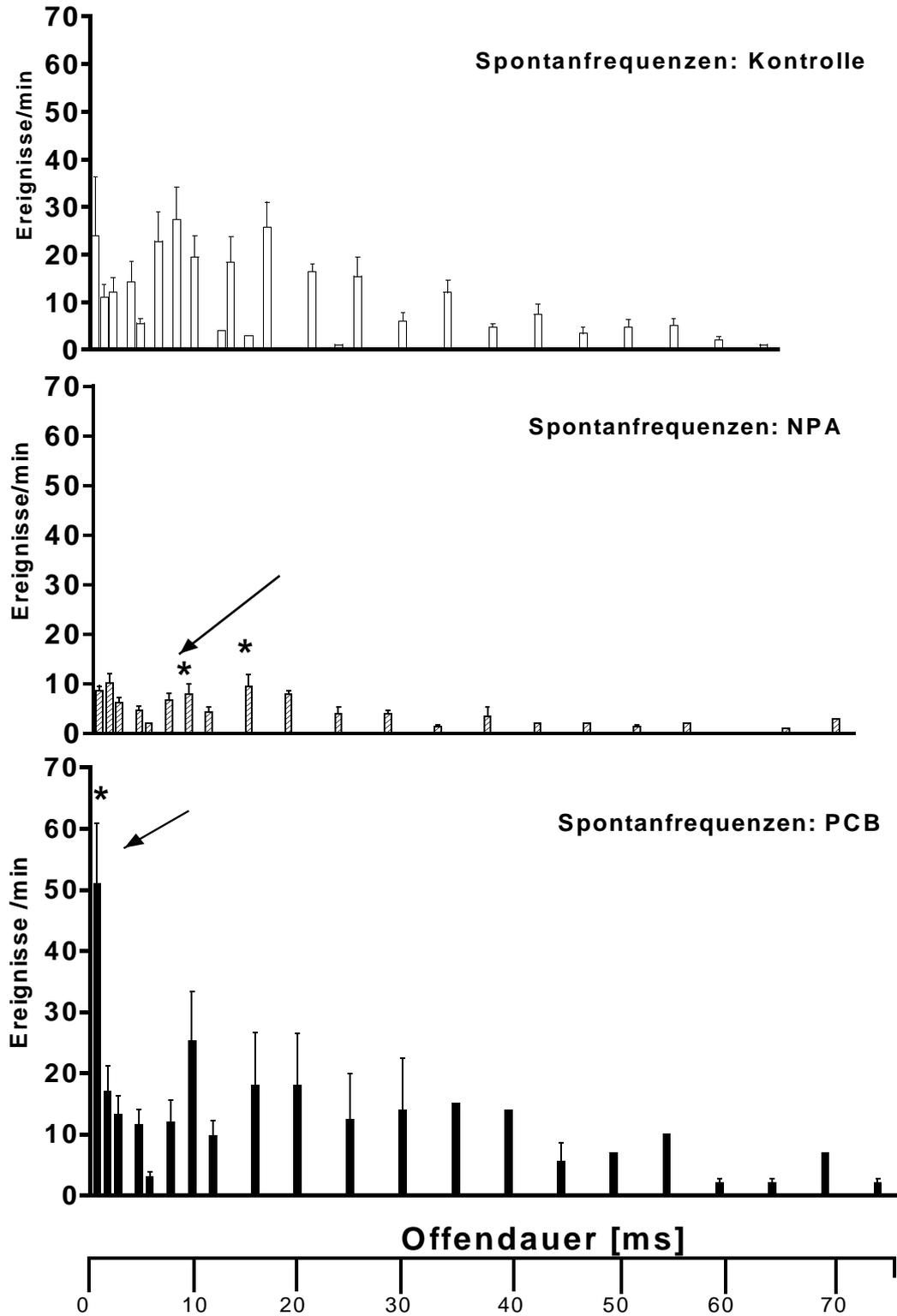


Abbildung 42c: Spontanfrequenzen versus Offendauer von Einzelkanalöffnungen für N = 4 Zellen, Kontrollen 5 Zellen pro Ansatz. Die Ansätze zeigen in Bezug auf Frequenz und Offendauer distinkte Werte und möglicherweise ein Quantelung. Spontane Einzelkanal-öffnungen treten deutlich häufiger auf, mit ca. 25/min, seltener langandauernde Calciumströme über 75ms (1/ min). PC

Die Spontanöffnungsdauer nach PCB-Vorbehandlung ist signifikant ($p < 0.05$) erhöht gegenüber den Kontrollen bei 1ms (versus NPA mit $p < 0.01$ hochsignifikant), das heißt, ein kurzes, schnelles Flackern der Calciumleitfähigkeiten ist zu beobachten, ansonsten nicht verschieden in Bezug auf Frequenz und Dauer. Das Gesamtintegral der Ionenströme ist unverändert ($AUC = 1561 \text{ nAms} = 1.56 \text{ pC}$).

Die spontane Öffnungsrate in den e- und nNOS-Inhibitor-vorbehandelten Zellen ist signifikant reduziert bei Offendauern von 8 und 12 ms und insgesamt tendenziell niedriger. Das kann bedeuten, dass die spontane Öffnung von Ionenkanälen durch die Stickstoffoxydsynthase 'feingestellt' wird.

Eine Inhibition der NOS bedeutet eine verringerte Offenrate (unter der Voraussetzung, daß das Inhibitorgemisch der e- und n-NOS nicht direkt Ionenleitfähigkeiten beeinträchtigt).

In den NPA-vorbehandelten Ansätzen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Calcium-Kanal-Spontanfrequenzen auf $< 15/\text{min}$, und einer AUC, die mit 0.73 pC im Vergleich zu Kontrolle (1.51 pC) und PCB (1.56 pC) um über 51% reduziert ist.

Hohe Offenzeiten sind bis 120ms vorhanden, über 135 ms fehlen sie in diesen Ansätzen vollständig. Das bedeutet, die Inhibition der Stickstoffoxydsynthase verringert die Spontanöffnungen oder anders ausgedrückt: eine funktionelle NOS ist essentiell für Spontanöffnungen und die ist durch das PCB zumindest nicht inhibiert. Sonst würde man eine Verringerung der Spontanfrequenz erwarten, wie sich aus den NPA-Ansätzen zeigt.

Mögliche Tragets für das einströmende Calcium sind verschiedene vesikelassoziierte Proteinsysteme, die einerseits auf der äußeren Vesikelmembran sitzend an die innere Zellmembran koppelnd zur Vesikelfusion führen können.

Die Vesikelbindung an zelluläre Strukturproteine ist ebenfalls calciumabhängig: steigende Calciumlevel in der Zelle verringern die Vesikelaufhängung an den Aktinfilamenten.

Nach gängiger Lehrmeinung werden zwei Arten von vesikulären Freisetzungsvorgängen unterschieden: der evozierte und der spontane Release, die sich auch hinsichtlich ihrer Calcium-Abhängigkeit unterscheiden. Ersterer ist calciumabhängig, während der spontane Release als nicht-Calcium-abhängig beschrieben wird. Oben gezeitige Ergebnisse zeigen, dass die Spontanfrequenzen der Öffnungen der Calciumleitfähigkeiten im Bereich sehr kurzer Offenzeiten höher sind. Vermehrt einströmendes Calcium 'primed' möglicherweise die zellulären Vesikel, und kann möglicherweise so deren Assoziation mit den zytoskelettären Proteinen verringern.

Da es einen winzigen Calcium-Leckstrom nach PCB 47 gibt kann in diesem Zusammenhang hier nicht von Calciumunabhängigkeit gesprochen werden.

Ohne zwischen verschiedenen Ionenleitfähigkeitstypen zu differenzieren, sind die spontanen Öffnungsraten auch NOS-Aktivitäts-abhängig, wie die Ansätze mit NPA zeigen.

5. Diskussion:

5.1 humane, von peripheren Blutmonozyten abgeleitete Makrophagen:

5.1.1 Charakterisierung der Zellkultur:

Die Strom-Spannungskurven im whole-cell-Modus der Makrophagen zeigen bei Spannungssprüngen bei einem Haltepotential von -60mV von Kationen getragene ab -40mV aktivierende Auswärtsströme bei Zellen die mindestens 24h oder länger in Kultur gehalten wurden. Per definitionem kann es sich dabei auch um von Anionen getragene Einwärtsströme handeln, da Makrophagen auch über spannungsaktivierte Chloridleitfähigkeiten verfügen (Nuttall et al., Dubyak et al. 1994). Die Ströme die kurze Zeit nach Ausplattieren, 3.5h in Kultur messbar sind, sind weitgehend passiver Natur. Dass die Ströme nicht chloridgetragen sind, belegt Abbildung (b), da die Ströme Cäsiumchlorid- sensitiv sind. Die Stromqualitäten sind danach signifikant verschieden mit $p < 0.05$ von denen der 3.5h alten Zellen und denen ohne Blocker der Kaliumleitfähigkeit.

Denkbar ist allerdings, dass kurz nach Ende der Präparation keine Ströme messbar sind, da die Zellen einem erheblichen physiologischen Stress ausgesetzt sind. Allerdings deckt sich die Beobachtung mit denen vieler elektrophysiologischen Beschreibungen der Eigenschaften von Makrophagen in Zellkultur.

In Mausmakrophagen und muriner Makrophagen abgeleiteter Zelllinie sowie bei Humanmakrophagen (Banati et al. 1991) wurden Kaliumauswärtsgleichrichter und deren Expressionsänderung in adhärenenten Zellen sowie in Abhängigkeit von Kulturzeitraum und Zytokin-Spektrum beschrieben (Eder et al. I, II und III, Fischer et al. 1995), die einerseits Kaliumselektivität zeigen und sensitiv für 4-Aminopyridin (5mM), Tetraethyl-Ammoniumchlorid (10mM, intrazellulär) oder Cäsiumchlorid (extrazellulär und intrazellulär) sind und über -50 mV aktiviert, während Einwärtsgleichrichter ebenso gefunden werden (Mikroglia der Ratte, Graeber et al., Streit et al., 1988, Rieseke 1989), spannungsaktivierbar unterhalb von -70 mV bis -130 mV und deren Leitfähigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängig ist.

Peritonealmakrophagen der Ratte durchlaufen eine stereotype Kanalexpressionsänderung nach Isolierung und in Kultur (Kettenmann et al. 1990, Eder, Fischer et al. 1997). Die Expression von bestimmten Leitfähigkeiten kann eng korreliert werden mit dem funktionellen Status der Zellen. Außerdem wurden durch extrazellulär appliziertes ATP aktivierbare Calciumleitfähigkeiten auf Makrophagen verschiedener Spezies gefunden (Naumov, et al. I und II, Nuttall und Dubyak, 1994, Ralevic und Burnstock 1998, Review), sowie in diversen Expressionssystemen studiert (King, Townsend-Nicholson, Burnstock 1998, Nuttall, Dubyak 1994). Bei einer murinen Makrophagen-Zelllinie, BAC 1.2F5, und für den P2X₇-Rezeptor in Xenopus-Oozyten konnte so die benzoyl-benzoyl-ATP-Spezifität gezeigt werden. Die über ATP-Rezeptoren induzierte Veränderung verschiedener anderer Oberflächenantigene (CD 23 und L-Selektin), vermittelt durch Metalloproteasen auf Makrophagen, wurde für den P2X₇-Rezeptor demonstriert (Gu, Bendall, Wiley et al., 1998).

Außerdem führt die Applikation von extrazellulärem ATP und ADP zur Aktivierung des Transskriptionsfaktors NF- κ -B und Apoptose bei Endothelzellen (von Albertini, Palmetshofer, Kacmarec et al., 1998) oder zur Transskription des proinflammatorischen Cytokins IL-1 β (Humphreys und Dubyak, I und II, 1998). Lipopolysaccharid als Induktor vieler proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β und der induzierbaren Stickstoff-oxydsynthese führt außerdem zu einer veränderten Kaliumleitfähigkeit: die Auswärtsgleichrichterkalium-leitfähigkeit ist insgesamt verringert, vermutlich durch Zellvergrößerung und damit geringere Kaliumkanal-Dichte auf murinen J 774.1 Zellen. In Mikrogliazellen wird ein Kalium-Auswärtsgleichrichter durch Interferon- γ induziert (Fischer, Eder, Hadding, 1995).

Diese elektrophysiologischen Eigenschaften Makrophagen-abgeleiteter Zellen verschiedener Spezies wurden auch bei der Charakterisierung der Humanmakrophagen im Wesentlichen bestätigt und sind entscheidend von Adhärenz und Zellalter abhängig.

5.1.2 Zellvitalitätsprüfungen und Funktionstests mit ATP:

Um die Beeinflussung des Makrophagenstoffwechsels durch PCB 47 zu bestimmen, wurde zunächst die zelltoxische Wirkung des PCBs in verschiedenen Konzentrationen bis 100 μ M und Inkubationszeiträumen bis zu 24h studiert.

Bis fünf Stunden Exposition mit PCB 47 und 100 μ M zeigt sich kein Hinweis für eine zellschädigende Wirkung von entweder DMSO oder PCB. Die signifikant verringerte Umsetzung des Tetrazoliumsalzes in das Azoprodukt nach 24h Inkubation kann zusammenhängen mit verringerter Aufnahme des Salzes oder einer Mitochondrienschädigung. Da die Zellen vier Stunden mit dem MTT-Substrat inkubiert werden müssen, um auch in den unbehandelten Ansätzen auf eine Absorption im linearen Bereich zukommen, ist bereits in diesen Ansätzen die Zellzahl verringert, das heißt, die Mediumzusammensetzung aus 1 Volumen Komplett-kulturmedium/ 1 Volumen Hanks-gepufferter-Saline ist über diesen Zeitraum toxisch. Relativ gesehen dazu ist der Quotient A_{450}/A_{650} in DMSO- und den PCB-Ansätzen erhöht, das Substrat wird also weniger umgesetzt und unter diesen Bedingungen ist eine 0.1% DMSO-Konzentration toxisch.

5.1.3 Erst- und Zweitantwort auf ATP:

Bei ligandengesteuerten Ionenkanälen oder G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren führt extrazelluläre ATP-Applikation zu einer zytosolischen Calciumerhöhung. Die ATP-Zweitantwort ist bei einem Intervall zwischen den ATP-Applikationen umso geringer, je kürzer der Abstand zwischen den ATP-Gaben, und erst ab einem Intervall zwischen der ersten und der zweiten ATP-Applikation von >40 Minuten gleichgross, führt also zu einer zytosolischen Erhöhung gleicher

Amplitude und Verlauf nach extrazellulärem ATP. Bei kleineren Abständen im Zeitintervall, etwa bei einem Zehnminutenintervall, wie bei Makrophagen zuerst von Oshimi et al. (1999) beschrieben, ist diese zweite evozierte Calciumveränderung signifikant reduziert, was mit zellulären Vorgängen der Regulation der Calcium-Sequestrierung in intrazelluläre Kompartimente und über Calcium-Pumpen in der Extrazellulärmembran zusammenhängen kann. Rezeptor-Inaktivierung und -Internalisierung spielen möglicherweise eine Rolle (Phosphorylierungsgrad der Rezeptoren,...). Allgemein werden diese Vorgänge als **Desensitivierung** beschrieben.

In keiner Weise vorbehandelte, nicht-ATP-reaktive Zellen müssen dementsprechend als nicht vital betrachtet werden oder tragen keine Purinrezeptoren auf der Oberfläche. Desensitivierung wird aber gemeinhin als reversibler Prozess verstanden. Nach 40 Minuten Abstand zwischen zwei ATP-Applikationen im Experiment ist die zytosolische ATP-induzierte Calciumerhöhung auf der Ebene von Einzelzellen im gepaarten T-Test nicht mehr signifikant verschieden, obgleich die Datenpaarung mit entsprechenden p-Werten effektiv ist. Das bedeutet, in Bezug auf diesen Parameter, für bei ATP-induzierter zytosolischer Calciumerhöhung ist die bei kürzeren Abständen beobachtete Desensitivierung reversibel.

Calciumströme und zytosolische Calciumerhöhungen nach ATP-Applikation wurden an vielen verschiedenen Zelltypen, darunter auch Makrophagen der Maus, der Ratte und des Menschen beschrieben (Rassendren et al, 1997, Greenberg et al. 1988, Nuttle et al., 1993).

An P2X-Rezeptoren wurde gezeigt, dass diese ligandengesteuert Calciumionen leiten, während P2Y-Rezeptoren G-Protein gekoppelte Effektorwege triggern, deren Aktivierung zu einer Calciumerhöhung aus intrazellulären Speichern führt (Benham et al., 1987, Dubyak 1991, Oshimi et al., 1996, 1999, Ralevic und Burnstock, 1998).

Dies gilt für mehrfach hintereinander appliziertes ATP genauso, bis zu einem Zeitraum von drei Stunden.

Werden die Zellen innerhalb dieser 40 Minuten mit der experimentellen Substanz, dem PCB 47, superfundiert, ist einerseits der basal messbare zytosolische Calciumspiegel unverändert und gleichzeitig die Reversibilität der ATP-induzierten Änderung des zytosolischen Calciumspiegels nicht beeinträchtigt.

Allerdings wurde für 10µM PCB 47 eine signifikante Verringerung der ATP-Zweitantwort beobachtet. Die erste ATP-Applikation führt an unbehandelten Zellen bereits zu überdurchschnittlich starker Zunahme des zytosolischen Calciums. Da die getesteten höheren PCB-Konzentrationen (und die DMSO-Kontrolle) eine unveränderte Reversibilität der ATP-Antwort zeigen, wurde dieser Beobachtung keine Bedeutung beigemessen. Anzumerken bleibt noch, dass das Löslichkeitsprodukt für PCB nicht überschritten werden darf, da sonst gepulste, oszillierende Calciumerhöhungen durch relativ erhöhte DMSO-Konzentrationen entstehen.

5.1.4 ATP-Konzentrations-Effektbeziehung bei 40 minütigem Abstand zwischen verschiedenen, randomisiert applizierten ATP-Konzentrationen und nach 5 Stunden PCB 47

Vorbehandlung:

Auf der Basis des Mindestabstandes für gleiche Calciumerhöhungen bei derselben ATP-Konzentration wurde eine Konzentrations-Effekt-Beziehung für ATP über einen Zeitraum von bis zu drei Stunden in randomisierter Abfolge der ATP-Gabe erstellt. Die Streuungen der Werte sind bei ATP-Konzentrationen im niedermikromolaren Bereich geringer als bei hohen ATP-Konzentrationen. Limitierend bei Applikationsreihen von bis zu drei Stunden ist in den Zellen die Fluoreszenzabnahme, die mit geringer werdenden Fura-Konzentrationen einhergeht. Da aber nicht immer die hohen Konzentrationen zuletzt gegeben wurden, scheidet dabei ein systematischer Fehler aus.

Mit zunehmender ATP-Konzentration steigt auch die evozierte zytosolische Calciumerhöhung, das heißt, höhere ATP-Konzentrationen sind effektiver in Bezug auf diesen Parameter. Die Konzentrations-Effektkurve wurde halblogarithmisch erstellt (dekadischer Logarithmus).

In der nicht-linearen Regression ist der mathematische Zusammenhang, der am besten die Lage der Datenpunkte beschreibt, eine sigmoide Funktion nach

$$f(x) = \text{Minimum} + \frac{\text{(Top-Minimum)}}{(1 + 10^{(\log EC_{50} - x)})}$$

und wird auch als logistische Gleichung für drei Parameter bezeichnet. Die Variable 'Minimum' ist der Y-Ratio-Wert des Minimum-Plateaus und entspricht experimentell dem basalen zytosolischen Calcium-Spiegel der Zellen und liefert Vergleichswerte für verschiedene Vorbehandlungen über einen längeren Zeitraum.

Nach iNOS-Inhibitor oder PCB-Vorbehandlung ist dieser Wert in allen Ansätzen unverändert. Die Variable 'Top' ist der Y-Wert im Maximum-Plateau und ist somit unmittelbarer Ausdruck dafür, welchen Wert der zytosolische Calciumlevel nach maximalen ATP-Konzentrationen annehmen kann. Der Term ' $\log EC_{50}$ ' ist der Logarithmus der Effektivkonzentration 50%, also die Agonistenkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft (in der doppelt-linearen Auftragung entspricht der 'Top'-Wert B_{max}). Mathematisch entspricht der Wert dem Wendepunkt der Kurve und ist in der ersten Ableitung ein Maximum, d.h. der Punkt der Kurve, in dem die Steigung maximal ist. Die Gleichung nimmt eine Standard-Steigung (gleich 1) an, bei der der Effekt von 10% bis 90% des Maximalwertes ansteigt, während die Agonistenkonzentration über zwei Zehnerpotenzen zunimmt. Diese Kurven-anpassung beschreibt die Lage der Datenpunkte besser als eine mathematische Anpassung mit variabler Steigung, die als Steigung den Hillkoeffizienten liefert, der Ausdruck für Kooperativität ist, d.h. der Annahme folgt, dass die Agonistenbindung an den Rezeptoren nicht unabhängig voneinander erfolgt.

Diese Steigung gilt nur dann, falls der beobachtete Effekt (zytosolische Calciumerhöhung) direkt proportional zur Rezeptorbesetzung durch den Agonisten ist, unabhängig davon, wie viele Zwischenschritte erfolgen, solange das Massenwirkungsgesetz gilt und angenommen werden kann, dass ein Agonist nur eine Bindungsstelle besetzt.

Bei doppelt-linearer Auftragung und hyperbolischer Anpassung gilt diese Aussage ebenso, solange die Produktion auch eines zweiten Botenstoffes proportional zur Rezeptorbesetzung durch den Agonisten erfolgt.

Purinerge Rezeptoren werden auf fast allen Organen und Geweben in unterschiedlicher Art und Zusammensetzung gefunden. Dementsprechend sind auch die Aussagen zur ATP-Effektivkonzentration variabel für EC_{50} -Werte von $10\mu\text{M}$ für den spezifischen $P2X_7$ -Agonisten, $35\mu\text{M}$ für ATP bei Lymphozyten (allerdings in Bezug auf Expression von CD 23 und L-Selektin) und über eine Konzentrationsspanne von 0.07 bis $500\mu\text{M}$ bei Rattenmakrophagen und immer auch entscheidend davon beeinflusst, ob in Expressionssystemen, Zelllinien oder Primärzellkulturen gearbeitet wurde. Für Humanmakrophagen sind EC_{50} -ATP-Konzentrationen von $37\mu\text{M}$ (Naumov et al. I und II, 1995) beschrieben.

Der Verlauf der Konzentrations-Effekt-Beziehung lässt, wie auch die Simulation der Daten in der Scatchard-Analyse zeigt, auf mehr als eine Assoziationskonstante für die Kontrolle schließen. Danach können drei linearisierte Anpassungen mit unterschiedlichen Dissoziations- respektive Assoziationskonstanten angepasst werden (Abb. 16b, $K_D = 1/K_A$). Dem ist durch sigmoide Anpassung der Daten nicht Rechnung zu tragen: ein mathematisches Modell für doppelt-sigmoide, nicht-lineare Regression existiert noch nicht, ist aber aufgrund der Datenstruktur anzunehmen.

Pharmakologisch bedeutet das für die Konzentrations-Effekt-Beziehung einerseits und in Bezug auf den betrachteten Parameter der intrazellulären Calciumerhöhung nach extrazellulärem ATP, dass auf drei verschiedene ATP-Rezeptoren geschlossen werden kann.

Akutexposition mit PCBs:

(a) PCB 47

Nach akuter PCB-Exposition der Makrophagen zeigen die Zellen über einen Zeitraum von über vierzig Minuten Belastung mit verschiedenen PCB 47-Konzentrationen keine spontanen Veränderungen des basalen Calciumlevels.

Auch ist die zweite durch ATP-evozierte zytosolische Calciumspiegeländerung im gepaarten T-Test nicht signifikant verschieden von der ersten evozierten Erhöhung vor PCB- Behandlung, wie auch in den Kontrollansätzen. Daraus kann geschlossen werden, dass das PCB 47 keinen inhibitorischen, agonistischen oder allosterischen Effekt auf die Purinrezeptoren der Makrophagen von extrazellulär ausübt. Diese Effekte sollten bei spezifischen Wirkmechanismen bei einer Einwirkdauer von 40 Minuten ansonsten zu erwarten sein.

Damit ist PCB 47 *kein* akuter Disruptor der Calciumhomöostase bei Humanmakrophagen, im Gegensatz zu anderen orthochlorierten PCB-Kongeneren bei verschiedenen zellulären Systemen wie etwa humanen Mastzellen oder Neutrophilen (Voie und Fonnum, 1999).

Zellen anderer Spezies wie Rattenastrozyten oder Zellen mit einer Ausstattung an spannungsaktivierbaren Calciumleitfähigkeiten mit Nifedipin-Sensitivität, wie bovine chromaffine Zellen (Messerli, Bickmeyer und Wiegand, nichtpublizierte Beobachtungen) oder cerebelläre granuläre Zellen der Ratte (Inglefield et al., 2000, Mundy et al., 2000) oder an Rezeptoren mit Calcium- und Chloridselektivität wie der γ -Aminobuttersäure A (GABA_A-R-Rezeptor in Neocortical-zellen der Ratte (Shafer et al., 2000) zeigen hingegen akute Veränderungen des zytosolischen Calciumspiegels nach PCB-Kongeneren, meist Aroclorgemischen wie 1254 zwischen zwei bis 20 μ M.

Daraus ist abzuleiten, dass neben einer Speziespezifität die Ausstattung einer Zelle mit bestimmten Proteinen über den Wirkmechanismus einer xenobiotischen Substanz entscheidet und weiter, dass damit auch eine Organspezifität solcher Substanzen einhergehen kann, da GABA-Rezeptoren bei Wirbeltieren nur im zentralen Nervensystem vorkommen aber peripher redundant sind.

Eine Interaktion von polychlorierten Biphenylen und Rezeptoren mit Purinrezeptoren ist bislang nirgends in der Literatur beschrieben worden.

Nach einer fünfstündigen Inkubationszeit mit dem PCB 47 ändern sich Verlauf und EC₅₀-Wert der Konzentrations-Effektbeziehung für ATP, während der basale Calciumlevel in den Zellen unverändert gegenüber der Kontrolle erscheint. Einerseits ist der EC₅₀-Wert gegenüber der Kontrolle mit verschoben, sodass man eigentlich von einer partiellen Inhibition sprechen muss, andererseits ist aber die ATP-induzierbare maximale Calciumänderung verändert, die ATP-Potenz erhöht. Diese erfolgt PCB-konzentrationsabhängig signifikant ab 50 μ M, wie Abbildung 16c belegt.

Die Konzentrations-Effektbeziehung für PCB 47 wurde durch alle Werte bis 50 μ M ATP angepasst, da die Kurve bei 100 μ M ATP bei 100 μ M PCB-Vorbehandlung zusammenbricht. Da die Zellviabilität bei hundert Mikromolar PCB 47 nach fünf Stunden nicht beeinträchtigt ist (wie die mitochondrialen Tetrazoliumtests belegen), kann eine zelluläre Dysfunktion als Ursache hierfür angenommen werden.

Den niedrigen B_{max}-Werten bei einer Anpassung für ein Zwei-Bindungsstellen-Modell zufolge, die den in den Abbildungen gezeigten Kurvenanpassungen widersprechen, sollten die Konzentrations-Effektbeziehungen auch Gleichungen mit mehr als zwei Variablen anzupassen sein, etwa für drei oder beliebig viele Variablen:

$Y = B_{max_1} * X / (KD_1 + X) + B_{max_2} * X / (KD_2 + X) + B_{max_3} * X / (KD_3 + X) + \dots + B_{max_n} * X / (KD_n + X)$, mit X = ATP-Konzentration und Y = Ratio F [340/380] unter der Voraussetzung, dass

'n' verschiedene Bindungsstellen für ATP vorliegen, die Bindung unabhängig voneinander erfolgt und das Massenwirkungs-gesetz gilt.

(b) Dosis-Wirkungskurve für PCB 77:

Die Konzentrations-Effektkurve nach fünf Stunden PCB 77-Vorbehandlung ist ebenfalls am besten anzupassen durch eine sigmoidale Konzentrations-Effektbeziehung mit einer EC_{50} von $9.74\mu\text{M}$ und damit ebenfalls gegenüber der Kontrolle rechtsverschoben. Der F-Test zum Kurvenvergleich, der die Summe der Quadrate über den Standard-Abweichungen und Freiheitsgrade einbezieht, liefert mit $F = 0.07$ keinen Unterschied zur Kontrolle. Das bedeutet, der PCB 47-Effekt ist stereospezifisch für das orthochlorierte PCB mit gleichem Chlorierungsgrad. Demnach entscheidet die sterische Anordnung der chlorierten Phenylringe der PCBs über die ATP-Potenz. Das koplanare PCB 77 ist als hauptsächlich immunotoxisch durch dioxinähnliche Wirkung nach Bindung an den zytosolischen Aryl-Hydrocarbonrezeptor beschrieben.

Der basale Calciumspiegel bei 5h PCB 77 vorbehandelten Zellen ist unbeeinflusst, akut-Experimente mit diesem Kongener wurden entsprechend der Fragestellung nicht durchgeführt.

(c) Purinrezeptorantagonisten: Inhibitionskurve von XAMR:

Zum Studium der PCB 47-Wirkung auf ATP-induzierte Calciumspiegeländerungen wurden nachfolgend verschiedene Inhibitoren an den Zellen auf ihre Wirkung hin getestet, den PCB-Effekt zu inhibieren. Das Suraminderivat XAMR (8-(3,5-Dinitrophenylencarbonyl-Imino)-1,3,5-Naphtalentrifluorsulfonsäure) ist als unspezifischer Antagonist an P2Y-Rezeptoren beschrieben (van Rhee et al.). Zum Testen der XAMR-Effektivität an den ATP-Rezeptoren wurde die ATP-Zweitantwort verwendet, d.h. wie auch schon in den akuten PCB-Experimenten wurden die Zellen mit hundert Mikromolar ATP stimuliert, mit XAMR superfundiert und nachfolgend die ATP-Zweitantwort aufgezeichnet. Die Abnahme der ATP-induzierten sekundären Calciumerhöhung ist XAMR-konzentrationsabhängig und signifikant verschieden von der unbehandelten Kontrolle ab $0.5\mu\text{M}$ XAMR. Der Verlauf der Inhibitionskurve ist außerordentlich steil, die IC_{10} - und IC_{90} -Werte sind bei 0.4 und $0.64\mu\text{M}$.

Insgesamt wurden nur fünf XAMR-Konzentrationen auf diese Weise getestet, ab $1\mu\text{M}$ war die ATP-Zweitantwort vollständig inhibiert. Bei älteren Zellen verläuft die Kurve weniger steil und der IC_{50} -Wert ist größer. Auf der Basis dieser XAMR-Inhibition der ATP-Zweitantwort wurde nachfolgend eine ATP-Konzentrations-Effektkurve für 10 Minuten $1\mu\text{M}$ XAMR erstellt. Die resultierende ATP-Konzentrations-Effektkurve zeigt eine Inhibition vor allem im Niedrigdosisbereich. Erstaunlicherweise reagieren die Zellen überhaupt. Das bedeutet, dass offensichtlich die ATP-Erstantwort den Inhibitor nicht unbeeinflusst läßt, sondern seine Effektivität verringert.

XAMR/PCB:

Die Konzentrations-Effektkurve für PCB 47 nach 10 minütiger Vorbehandlung mit dem Purinrezeptor-Antagonisten XAMR ist auf Kontrollniveau mit einem EC_{50} -Wert von 3.29 , der F-Test

liefert ein $F=0.59$ und ist, wie durch einen Test des p-Wertes zu bestätigen, damit nicht signifikant verschieden von der Kontrolle.

Der P-Wert-Test testet die Nullhypothese, dass zwischen zwei Kurvenanpassungen kein Unterschied besteht. Das bedeutet, dass die durch das PCB-hervorgerufene erhöhte ATP-Potenz durch den Antagonisten reduziert werden kann und spezifisch an den Purinrezeptoren erfolgt, ohne dass dadurch aber eine Aussage über den PCB-Wirkort getroffen werden kann.

Suramin:

Nach Townsend-Nicolson, King und Burnstock (1999) liefert der spezifische Antagonist G-Proteingekoppelter Purinrezeptoren in patch-clamp-Experimenten in Konzentrationen bis $1\mu\text{M}$ verstärkte Ionenströme bei heterodimeren Rezeptoren aus P2X_2 und P2X_4 -Untereinheiten (ionotropen Chimären aus $\text{P2X}_2/\text{X}_4$) bei *Xenopus laevis*-Oozyten. Dass solche Mischformen auf Humanmakrophagen in dieser oder ähnlicher Form ebenfalls vorkommen mögen, kann nicht ausgeschlossen werden.

In den Calciumspektrofluorimetrie-Experimenten nach Suramin nimmt die ATP-induzierte Calciumspiegel-erhöhung im Vergleich zur Kontrolle zu, was diese Beobachtung von Townsend et al. untermauern würde. Laut Literatur ist der IC_{50} -Wert für Suramin mit $19\mu\text{M}$ angegeben. Bei den Humanmakrophagen zeigt sich bereits unterhalb dieses Wertes eine drastische Veränderung des basalen zytosolischen Calciumlevels nach Vorinkubation mit dem Antagonisten, die Fläche unter der Kurve entspricht im Wesentlichen den Peakamplituden der ATP-Antworten. Ab $10\mu\text{M}$ zeigen sich vermutlich unspezifische Effekte, was sich auch in einer oszillierender Basallinie des Calciums widerspiegelt.

Für Suramin ist neben der Wirkung als Inhibitor liganden gesteuerter Ionenkanäle auch eine neuroprotektive Wirkung bei ischämischen Bedingungen und erhöhten Glutamatkonzentrationen beschrieben (Bezvenyuk et al., 2000). Diese beruht partiell auf einer Inhibition der Proteinkinase C (PKC), was die Oszillationen erklären kann.

Insgesamt wurden aber keine eindeutigen Werte für diesen Inhibitor erzielt.

Die Versuche mit den beiden unspezifischen Purinrezeptorantagonisten belegen, dass die ATP-vermittelte zytosolische Calciumspiegelerhöhung durch Purinrezeptoren vermittelt ist, und dass an der PCB-vermittelten Verschiebung der ATP-Konzentrations-Effektkurve P2Y -Rezeptoren beteiligt sind.

5.1.5 Agonistenscreening und Rezeptordiskriminierung für PCB-Suszeptibilität:

Nach Ralevic und Burnstock (1998) bzw. Townsend-Nicolson, King und Burnstock (1999) existieren momentan nur wenige als spezifisch gesicherte Inhibitoren bestimmter Purin-Rezeptoren (Trends in pharmacological sciences, 2000). Das erschwert das Studium der einzelnen ATP-Rezeptor-Subklassen. Für verschiedene Agonisten gilt dies nicht in solch strengem Maße: für einzelne der Rezeptoren der beiden Subklassen sind spezifische Agonisten beschrieben, wie etwa für die P2X₁ und X₃-Rezeptoren α,β -me ATP und β,γ -meATP, 2',3'-[4-O-benzoyl-benzoyl]-ATP für P2X₇-Rezeptoren und UDP bzw. UTP für P2Y₄ und Y₆ bzw. P2Y_{2,4} und Y₆-Rezeptoren (Ralevic und Burnstock, 1997).

Aus den ATP-Vorversuchen zeigte sich eine langanhaltende Desensitivierung bei wiederholter Agonistenapplikation über vierzig Minuten für ATP.

Die einzelnen Agonisten wurden in der aus den Ansätzen ersichtlichen Reihenfolge appliziert.

Vorversuche zur Desensitivierung nach einem Agonisten wurden durchgeführt für benzoyl-benzoyl-ATP (Dibenzoyl-ATP), UDP, UTP und ATP. Nach 20 μ M 2',3'-(4-o-benzoyl-benzoyl)-ATP sind die Zellen bis zu drei Stunden nicht in der Lage, nochmals auf eine Applikation des Agonisten zu reagieren. Das kann damit zusammenhängen, dass benzoyl-ATP einerseits als sehr spezifisch für P2X₇-Rezeptoren beschrieben ist, andererseits läßt dieses Verhalten auf eine effektive Desensitivierung schließen, entweder nach Rezeptor-Internalisierung oder funktioneller Inhibition.

Für UDP und UTP ergab sich hinsichtlich des Antwortverhaltens nach wiederholter UDP und UTP-Gabe kein sehr einheitliches Bild. Prinzipiell lässt sich aber feststellen, dass die Rezeptoren erst nach dreimaliger Agonistengabe desensitivieren. Für die oben gezeigten Versuche bedeutet das, dass die Zellen zwar äquieffektiv mit 100 μ M UDP und nachfolgend UTP stimulierbar sind. Dies bedeutet aber nicht, dass unterschiedliche Rezeptoren angesprochen werden. Einige der Zellen reagieren nur auf UDP, andere nur auf UTP, die meisten, etwa 90%, auf beide Agonisten.

Nach PCB 47 führen sowohl benzoyl-benzoyl-ATP und UTP-Applikation zu einer signifikant stärkeren zytosolischen Calciumerhöhung.

Das Screening-System leistet also zweierlei: erstens können durch die konsekutive Abfolge der verschiedenen spezifischen Agonisten Aussagen darüber getroffen werden, welche Rezeptoren auf den Humanmakrophagen vorliegen und zweitens, welche dieser Rezeptoren PCB 47 sensitiv sind.

Nicht alle dieser Rezeptoren sind aber empfindlich gegenüber PCB 47-Exposition.

Dieses Screening-System ist also nur dann aussagekräftig, falls eine Desensitivierung der Rezeptoren völlig unabhängig von der Suszeptibilitätszunahme nach PCB 47 ist.

Rein mechanistisch liefert es aber wichtige Hinweise zur veränderten ATP-Suszeptibilität der Zellen.

5.1.6 Funktion und Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase

(a) N^G-Amino-L-Arginin/PCB-Versuche:

Nach Vorversuchen mit dem Inhibitor der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase nimmt die ATP-Potenz bei Konzentrationen ab 20µM Inhibitor signifikant zu, der Inhibitor führt selber ATP-unabhängig zu keiner unspezifischen Veränderung der Calciumregulation in den Zellen.

N^G-Amino-L-Arginin ist als spezifischer Inhibitor der induzierbaren NOS beschrieben (Nakatsubo et al., 1998, Stuehr, D.J. 1991).

Die erstellte Konzentrations-Effektkurve für ATP nach 1.5h Vorbehandlung mit der in den Vorversuchen subeffektiven Konzentration [10µM] N^G-Amino-L-Arginin zeigt einen EC₅₀-Wert von 5.2µM und ist mit $F = 15.64$ deutlich verschieden von der Kontrolle. Im Unterschied zu dieser empfiehlt eine mathematische Anpassung nach nichtlinearer Regression doppeltlinearer Auftragung die hyperbolische Anpassung für nurmehr *eine* Bindungsstelle im Unterschied zu Kontrolle und PCB 47-Vorbehandlung. Das kann bedeuten, dass erstens verschiedene ATP-Rezeptoren mit unterschiedlicher Suszeptibilität gegen NO existieren, die Expression der Purinrezeptoren nach NAA verändert ist, oder drittens allosterische Effekte an der funktionellen NOS eine Bindungsqualität bedeuten. Angesichts eines EC₅₀-Wertes von 5.2 gegenüber der Kontrolle von 4.04 µM ist die Inhibition demgegenüber vernachlässigbar.

Aus dieser Beobachtung im Vergleich zu der nach PCB 47 ist die Annahme entstanden, das PCB 47 könne einen ähnlichen Wirkmechanismus haben wie das N^G-Amino-L-Arginin: eine Inhibition der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase.

Die Präinkubation mit sowohl PCB 47 als auch NOS-Inhibitor blocken die ATP-Konzentrations-Effektkurve effizient auf Kontrollniveau, obschon ein synergistischer Effekt zu erwarten gewesen ist. Da die DMSO-Konzentration 0.1% nicht überschreitet, handelt es sich hierbei um einen spezifischen physiologischen Effekt, und nicht etwa um eine DMSO-verursachte Kurvenverschiebung. Der EC₅₀-Wert der daraus resultierenden Konzentrations-Effektkurve liegt bei 6.72µM, ist also im Vergleich zur Kontrolle rechtsverschoben, und in Bezug auf die N^G-Amino-L-Arginin Konzentrations-Effektkurve und PCB 47-Konzentrations-Effektkurve dazwischen. Das bedeutet weiterhin, dass NOS-Inhibition durch NAA und PCB nicht an derselben Stelle des Enzyms erfolgen, da die Kurven sonst zumindest beide nach einem Ein-Bindestellen-Modell anpassbar sein müssen.

Weshalb die Doppelbehandlung zu einem Zusammenbruch der ATP-Antwort führt, ist unklar. Denn auch in Bezug auf den weiteren bestimmten Parameter der zyklischen Nukleotide wirken NAA und PCB 47 synergistisch.

Der Inhibitor XAMR in Verbindung mit dem NOS-Inhibitor wurde nicht getestet.

(b) iNOS- Immunohistochemie:

Für orthochlorierte PCBs sind verschiedene genotoxische Effekte beschrieben, dabei steht eine Phenobarbital-ähnliche Induktion von Cytochromen P450 1A1, 1A2 und 3A im Vordergrund. Das ist in Bezug auf die iNOS-Expression vor allem deshalb von Bedeutung, da Mechanismen der NO-Entstehung in verschiedenen Geweben (vor allem der Leber und humanen Polymorphkernigen Neutrophilen) beschrieben sind, die Cytochrom P450-abhängig und *iNOS-unabhängig* zu einer Entstehung reaktiver Stickstoffradikale führen können (Holm et al., 1999).

Die induzierbare Stickstoffoxydsynthase ist in der Zellkultur basal exprimiert vorhanden. Deren Expression ändert sich nach fünf Stunden PCB 47-Behandlung nicht. Die basale Expression war auch nach den Versuchen mit dem NOS-Inhibitor zu erwarten. Woher die Basallevel der iNOS-Expression in den Zellen kommt, ist unklar, denn verwendete Kulturseren sind Endotoxin-getestet und die TNF α -Level sind unterhalb des Detektionslimits. Daher ist nicht auszuschließen, dass in Zellen ohne basale NOS-Expression diese durch das PCB angestoßen werden kann.

Mit kurzfristiger LPS-Inkubation steigt aber der Level an NOS, sodass zumindest angenommen werden kann, dass PCB 47 kein spezifisches Signal zur NOS-Induktion bei Humanmakrophagen ist. Nach MacMicking et al. gibt es weder bei Makrophagen noch den meisten anderen Zellen mit induzierbarer NOS eine Expression dieses Proteins ohne einen induktiven Vorgang. Meist sind es Zytokine oder mikrobielle Produkte, die synergistisch die NOS2-Expression beeinflussen können. Bis heute ist die Steuerung der NOS-Expression, vor allem der induzierbaren Isoform sicher eines der umstrittensten Themen der Biochemie.

Dass in der Zellkultur basal bestimmte Zytokine vorhanden sind wird ebensowenig auszuschließen sein wie die Tatsache, dass der Präparationsvorgang Stress für die Zellen bedeutet. Nach einmaliger Induktion bleibt das Enzym ohne weiteren Induktor über bis zu fünf Tage stabil (MacMicking et al, 1999). Das bedeutet, auch ein Mediumwechsel ändert hieran nichts. Basal messbare TNF- α -Level sind aber an der Nachweisgrenze oder darunter.

Nach Herstellerangaben (Fa. Alexis) ist der verwendete Antikörper zwar zum Nachweis sowohl der murinen, Ratten- und humanen iNOS geeignet, da gegen eine hochkonservierte Region mammalianischen NOS-Proteins gerichtet, Kreuzreaktivitäten sind aber nicht völlig auszuschließen.

Desweiteren bleibt somit festzustellen, dass der beobachtete PCB 47-Effekt bei diesen Zellen *nicht* auf einer veränderten Expressionsrate der Stickstoffoxydsynthase beruht.

Dass die iNOS-Expression durch 100s benzoyl-benzoyl-ATP-Gabe spezifisch zu inhibieren ist, ist eine neue Beobachtung. Diese ist einigermaßen erstaunlich, da unter physiologischen Bedingungen zu erwarten ist, dass ATP (oder ein stabiles Analogon) als P2X₇-Ligand vorwiegend bei entzündlichen Prozessen freigesetzt wird, in dessen Folge es gewöhnlich aber zu einer Induktion des Enzyms NOS kommt.

Ob es, wie der spezifische Rezeptor-Ligand benzoyl-benzoyl-ATP belegt, einen spezifischeren *endogenen* Liganden als ATP für diesen Rezeptor geben kann, bleibt unklar, ist allerdings denkbar. Somit wären die Zellen in der Lage, die Enzymexpression sehr genau zu regulieren, was durchaus Sinn macht. Denn man kennt oftmals die Prozesse, die entzündliche Reaktionen im Immunsystem auslösen, aber seltener sind Signale bekannt, die solche Prozesse abzuschalten in der Lage sind. Ein Beispiel hierfür ist das antiinflammatorische Cytokin Interleukin 10 (IL-10) und andere.

Wie von Humphreys und Dubyak 1998 gezeigt, triggert die Aktivierung des P2X₇-Rezeptors allerdings die Reifung und die Freisetzung des *proinflammatorischen* Cytokins IL-1 in Monozyten und Makrophagen. Die Expression dieses Rezeptors selber wird synergistisch durch die gleichen Stimuli und Zytokine ausgelöst, wie auch die Expression der iNOS.

LPS, INF- γ und TNF- α induzieren in THP-1- Monozytenzelllinien den P2X₇-Rezeptor, das zellpermanente cAMP-Analogon dibutyryl-cAMP reguliert die Expression des Rezeptors negativ. Ein erhöhter cAMP-Gehalt reprimiert die Expression dieses Rezeptors (nicht jedoch in P2X₇-transfizierten HEK-293-Zellen).

Bislang war aus der Literatur nur bekannt, dass der P1_{A1}, sowie P2Y₁, P2Y₂ und P2Y₄-Rezeptoren in stimulatorischer Weise an das NOS-System koppeln (Ralevic und Burnstock, 1998). Daher wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass kurzfristige ATP-Applikation bei diesen Zellen die NOS-Expression erhöht. Beschrieben ist dies allerdings bislang nur für erstens höhere Konzentrationen (bis 300 μ M und längere Inkubationzeiten, bis zu 16 Stunden). Der P2X₇-Rezeptor besitzt in verschiedener Hinsicht Besonderheiten für einen ionotropen Calciumkanal: denn einerseits ist die Bildung einer nicht-selektiven Pore (GAP 43, Beyer et al., 1991) nach Dibenzoyl-ATP-Stimulation beschrieben, deren Funktion lange unklar war, mit einer Leitfähigkeit auch für größere Moleküle bis 900kDa. Andererseits hat das Rezeptorprotein eine ausge-sprochen lange N-terminale Domäne (240 Aminosäuren, von denen etwa die letzten 170 Aminosäuren funktionsbestimmend sind), was zumindest eine Kopplung an weitere Signaltransduktionsprozesse nahe legt, was ungewöhnlich für ionotrope Kanalproteine ist.

Die Expression ist auch bei LPS-Gabe und nachfolgender Dibenzoyl-ATP-Applikation und nach PCB-Inkubation statistisch signifikant verringert.

Die physiologische Rolle dieses Rezeptors ist vermutlich, wie von Silverstein et al. (bislang unveröffentlichte Beobachtungen) beschrieben, eine Leitfähigkeit größerer anionischer Peptide aus phagozytierten Membranarealen in das Zytosol zur weiteren Prozessierung durch Phagosom, TAP-Transporter und Präsentation durch MHC-I.

(c) NO-Freisetzungsexperimente:

Die Verschiebung der ATP-Dosis-Wirkungskurve ist durch sowohl das PCB als auch den iNOS-Inhibitor, wie mit dem spezifischen NOS-Inhibitor (NAA) gezeigt werden konnte, teilweise auf eine Verringerung der NO-Produktion in den Zellen zurückzuführen, die die Rezeptoren empfindlicher für den Liganden, Adenosintriphosphat, macht (Abbildung 10).

Im Lactatdehydrogenase-gekoppelten Assay für Gesamtnitrit verringert eine steigende PCB-Konzentration innerhalb von 5h Inkubationszeit bei LPS-induzierten Zellen die NO_x-Produktion der Makrophagen. PCB 47 interagiert nicht mit den Griess-Reagentien, wie in einer einfachen Griess-Reaktion mit Bestimmung der Absorptionswerte für 5µM Nitrit überprüft wurde. NO-Bestimmungen schlicht mit den beiden Griessreagentien ohne die LDH-gekoppelte Primärreaktion des Assays, die, wie aus den Standardwerten abzuleiten ist, in etwa halb so empfindlich ist, haben bislang keine detektierbaren NO-Werte geliefert, das Ergebnis beruht also auf zwei voneinander unabhängigen Assays für Gesamtnitrit.

Unter den gegebenen Bedingungen bedeutet ein stärkerer ATP-induzierter Calcium-Einstrom nach iNOS-Inhibition, dass NO-Spezies die Purinrezeptoren unter physiologischen Bedingungen direkt oder indirekt negativ regulieren.

Dies konnte eindeutig gezeigt werden: eine Vorbehandlung der Zellen mit entweder NAA oder PCB 47 bei unveränderter iNOS-Expression führt gleichermassen zu einer signifikant stärkeren ATP-induzierten zytosolischen Calciumerhöhung. Appliziert man den Zellen NAA oder PCB 47 und nachfolgend den NO-Donor SNAP, ist die ATP-Antwort auf Kontrollniveau.

Eine PCB-Vorbehandlung in den Zellen führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme freigesetzten Gesamtnitrits, das als verlässlichster Parameter für zellulär produziertes NO gilt.

Ob das zelluläre NO unmittelbar die Purinrezeptoren reguliert oder indirekt über ein weiteres Zwischenprodukt, wird im Abschnitt zyklische Nukleotide beantwortet werden. Denn ein verringerter NO-Spiegel in den Zellen führt zu verringerten basalen Spiegeln an zyklischen Nukleotiden, die die ATP-Rezeptoren regulieren.

5.1.7 TNF α -Freisetzungsexperimente:

Der Zeitverlauf der Zytokinfreisetzung nach LPS beginnt laut Literatur (Schins und Borm, 1995, Wendel et al. 1996) mit der TNF α -Freisetzung nach 1.5h (Maximum, gefolgt von IL-1 (6h) und IL-6 (8h) (Zwilling, Eisenstein). In den Ansätzen ist danach das Maximum nach LPS (das als Positivkontrolle verwendet wurde) wahrscheinlich bereits nach $t < 5h$ erreicht, die Abnahme nach 16h kann mit einer Wiederaufnahme über membranständige TNF α -Rezeptoren erklärt werden. Dass die Kontrollwerte leicht ansteigen, kann Serum-induziert sein oder mit der Applikationsform (1/1 v/v Medium/HBS) zusammenhängen.

Die deutliche Zunahme nach 10h nach ATP spricht für einen Sekundäreffekt, da die ATP-Inkubationszeit bei 100 Sekunden liegt. Weder Dibenzoyl-ATP noch PCB führen zu einer Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$. Die Werte liegen am Detektionslimit, was in Bezug auf die Kontrollwerte durch eine Inhibition erklärbar und ab 10h Inkubationszeit mit $p < 0.001$ signifikant niedriger als in der unbehandelten Kontrolle ist. Möglicherweise ist dies ein Dexamethason-artiger Effekt (s. Einleitung).

5.1.8 Einfluß von PCB 47 auf die zellulären Level zyklischer Nukleotide und die Calcium-calmodulinkinase

KN-62, ein Inhibitor der Calciumcalmodulinkinase II

- (1) KN-62 verändert die ATP-Zweitantwort nach 30 minütiger Behandlung bis $7.5\mu\text{M}$ nicht. Dies wurde getestet, indem Zellen als Funktionstest mit $100\mu\text{M}$ ATP stimuliert wurden, anschliessend 30 Minuten mit KN-62, nachfolgend wiederum mit $100\mu\text{M}$ ATP, wie in den paired t-Test-Ansätzen und der PCB 47 Akutexposition (nicht gezeigt).
KN-62, ein Inhibitor der Calcium-Calmodulinkinase (Rattenhirn, IC_{50} von $19\mu\text{M}$) und spezifischer Antagonist für den P2X_7 -Rezeptor (IC_{50} -Wert von 100nM) blockiert in der Agonistenapplikation selektiv $2',3'$ -[4-0-benzoyl-benzoyl]-ATP induzierte Calciumerhöhung. Die durch die Agonisten hervorgerufene intrazelluläre Calciumerhöhung nach α,β -Methyl-ATP, UDP und UTP ist unbeeinflusst. Diese KN-62-Konzentration ist unwirksam in Bezug auf die Inhibition der Calciumcalmodulinkinase II-beeinflusste Langzeitdepression im Rattenhirn, wie von Schnabel et al., 1999 gezeigt.
- (2) Für fünf stündige PCB 47-Vorbehandlung sind die $2',3'$ -[4-0-benzoyl-benzoyl]-ATP- und die UTP-evozierten intrazellulären Calciumspiegelerhöhungen verstärkt, bei UDP nur tendentiell erhöht.
- (3) PCB 47 zusammen mit KN-62 führt zur signifikanten Reduktion der Wirksamkeit aller verwendeten Agonisten in Bezug auf die durch die Agonisten hervorzurufende intrazelluläre Calciumerhöhung.
- (4) Die Calciumcalmodulinkinase wird nicht durch das PCB gehemmt, denn der Effekt von KN-62 auf die Rezeptorfunktion und der Effekt des PCB auf die Rezeptorfunktion sind invers.
- (5) Die Rezeptorfunktionen der Purinrezeptoren bedürfen dennoch einer funktionellen Calciumcalmodulin-kinase.
- (6) Der basale Calciumlevel ist weder nach PCB47 noch nach PCB 47/KN-62 verändert.

Dennoch ist der Effekt des PCB 47 auf ein in Bezug auf die Calciumcalmodulinkinase stehendes System zurückzuführen, nämlich den zytosolischen cAMP-Spiegel und vermutlich die davon aktivierte Proteinkinase A, die über Phosphorylierungen/Dephosphorylierungen die Funktionszustände von Rezeptoren ändert.

hohe Level an zyklischen Nukleotiden:

Phosphodiesterasen sind bei Humanmakrophagen in fünf verschiedenen Isoformen beschrieben (Review, Essayan, D.M.) PDE 3 existiert in zwei verschiedenen Isoformen, die beide cGMP-abhängig sind und PDE, die cAMP-spezifisch und cGMP insensitiv ist.

Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich einerseits nach der Natur ihres Liganden (PDE 3: Isoform I: cAMP, K_m 0.2, II: cGMP K_m 0.3, außerdem PDE 4 mit einem K_m -Wert für cAMP von 4 und cGMP >3000) und dessen Konzentration. In der Zellkultur humaner Makrophagen ändert sich das Expressionsmuster der Phosphodiesterasen. Nach 8 Tagen in Kultur ist die PDE 1 vorherrschend (Gantner et al., 1999).

(a) cAMP-Abhängigkeit der Purinrezeptoren:

cAMP ist in das Geschehen der Rezeptorregulation von Purinrezeptoren involviert, wie die Antworten nach 15 Minuten 8-bromo-cAMP eindeutig zeigen.

Hohe cAMP-Level durch das zyklische Nukleotid-Derivat 8-bromo-cAMP legen die Antworten an fast allen Rezeptoren lahm. Das bedeutet, dass im funktionellen Zustand ein niedriger cAMP-Gehalt im Cytosol für die Rezeptorfunktion essentiell ist.

Da am P2X₇-Rezeptor die PCB-induzierte Zunahme des zytosolischen Calciums nach benzoyl-benzoyl-ATP durch 8-bromo-cAMP auf den Kontrolllevel zu bringen ist, kann daraus geschlossen werden, dass das PCB den cAMP-Spiegel verringert, was sekundär zu einer verstärkten Rezeptorfunktion führt. Das bedeutet weiterhin, dass der Rezeptor in Verbindung mit Änderungen des zytosolischen cAMP-Gehaltes seine Funktionszustände ändert. Die UDP- und UTP-abhängigen Rezeptoren werden nach PCB durch das cAMP nicht auf den Kontrolllevel gebracht.

(b) cGMP-Abhängigkeit der Purinrezeptoren:

Dass gerade P2Y-Rezeptoren vom UDP und vorallem UTP-sensitiven Typ cGMP-anfällig sind, ist mit einiger Wahrscheinlichkeit dadurch zu erklären, dass ein erhöhter cGMP-Spiegel auch relativ die G-Proteine indirekt inhibiert, da thermodynamisch betrachtet weniger GMP rekrutiert werden kann zur GTP-Pool-Restitution. Auch der GDP-Spiegel wird steigen, da die Guanylatzyklase in ihrer Aktivität durch cGMP gehemmt wird. Ob diese Effekte allerdings direkt auf die PCB-Wirkung zurückzuführen sind durch Inhibition der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase oder direkt durch Verringerung des cGMP-Spiegels, lässt sich nicht ganz eindeutig zeigen. Wenn man davon ausgeht, dass das PCB 47 einen mehr oder weniger spezifischen Liganden hat,

und es somit einen gemeinsamen Nenner gibt, wäre ein zentrales Enzymsystem betroffen.

Das wurde durch den Analogschluss der NOS-Inhibition gezeigt, was allerdings kein direkter Beweis ist. Der Effekt nach dem NOS-Inhibitor, für den Konzentrationen von 0.1 bis 50µM getestet wurden, ist ausserdem nicht so drastisch wie nach dem PCB. Daher würde eher ein der NOS zugeordnetes oder übergeordnetes Enzymsystem in Frage kommen. In Rattenmakrophagen wurde (Naumov et al. 1995) ein durch extrazelluläres ATP aktivierter aber durch Aktivierung von G-Proteinen gateder Calciumionenkanal beschrieben. Das Gaten des Kanals kann auch unabhängig vom extrazellulär applizierten Liganden erfolgen und zeigt demnach Eigenschaften, die für ligandenaktivierte Ionenkanäle anderer Zelltypen in der Form bisher nicht beschrieben sind.

Alle Phosphodiesterasen **aktivieren** durch das durch entweder die Adenylatzyklase oder die Guanylatzyklase generierte zyklische Monophosphat des ATPs oder GTPs durch Abbau zu AMP und GMP, das unter physiologischen Bedingungen cAMP- oder cGMP-Proteinkinasen vom inaktiven in den aktiven Zustand überführt (und darüber hinaus entsprechend sensitive Ionenkanäle zu gaten in der Lage ist, s. Tabelle 1). Diese Proteinkinasen (Proteinkinase A für cAMP oder Proteinkinase G für cGMP) phosphorylieren eine Unzahl zellulärer Proteine und verändern somit die Stoffwechsellage und den funktionellen Zustand der Makrophagen. Einen Sonderfall stellt die PDE I dar, die ebenfalls für beide Nukleotid-Derivate spezifisch ist, (cAMP 1-30µM, cGMP 3µM), aber durch Calciumcalmodulin aktiviert wird.

cGMP scheint essentieller Bestandteil vieler der studierten Rezeptorsysteme zu sein. Die PCB-Effekte der intrazellulär erhöhten Calciumlevel nach benzoyl-benzoyl-ATP und nach UTP sind unterschiedlich sensitiv für hohe Spiegel an cAMP oder cGMP durch die entsprechenden 8-bromo-Derivate.

Am UTP-Rezeptor ist die zytosolische Calciumerhöhung nach PCB 47-Vorbehandlung erhöht. Nach PCB 47 und 8-bromo-cGMP, also einer Anhebung des zytosolischen cGMP-Spiegels, ist die zytosolische Calciumerhöhung auf Kontrollniveau. Das 8-bromo-cAMP hat auf den PCB-Effekt der zytosolischen Calciumerhöhung keinen Einfluss. Das bedeutet, dieser UTP-Rezeptor ist sensitiv für hohe oder verringerte cGMP-Spiegel.

Am P2X₇ – Rezeptor, also nach benzoyl-benzoyl-ATP-Applikation sind die PCB-Effekte nicht durch Gabe von 8-bromo-cGMP reversibel, das heisst, dieser Rezeptor ist für Änderungen des cGMP-Spiegels empfindlich. Die hier beobachteten PCB-Effekte sind durch hohe Spiegel an zyklischem cAMP reversibel, d.h. Auf Kontrollniveau zu bringen. Dieser Rezeptor ist sensitiv für Änderungen des zytosolischen cAMP-Spiegels.

Da es viele Ionenleitfähigkeiten, auch monovalenter Kationen gibt, die nach zyklischen Nukleotiden wie cGMP aktivieren, können die beobachteten Effekte auch auf einen veränderten Kaliumhaushalt zurückzuführen sein, da nach 5h PCB 47 die Zellen erheblich geschwollen erscheinen. Eine Verringerung des cGMP-Spiegels in den Zellen würde die Spontanaktivität der

Kaliumkanäle verringern, späterer Zusatz von 8-bromo-cGMP würde diese wieder restituieren. Das erklärt möglicherweise den gefundenen Zusammenhang zwischen dem CaCAMK-Inhibitor, KN-62, 8-bromo-cAMP und den PCB-Effekten bei den Makrophagen:

Nach 8-bromo-cAMP alleine sind die Rezeptoren praktisch bei allen Agonisten weniger empfindlich für ihren Liganden. PCB 47 zusammen mit 8-bromo-cAMP führt ausser beim benzoyl-benzoyl-ATP-Rezeptor zu zytosolischen Calciumerhöhungen wie in den Kontrollen, aber eine komplette Inhibition des PCB Effektes mit PCB/KN-62 Vorinkubation. Das bedeutet, dass der überwiegende Teil der Rezeptoren PDE-I-abhängig ist, die durch KN-62 inhibiert (über CaCAMK II) wird (da alle PCB-verstärkten Effekte durch KN-62 reversibel sind), durch 8-bromo-cAMP in Verbindung mit PCB-Vorinkubation aber nicht, da die Phosphodiesterase I durch das PCB positiv moduliert ist. Die cGMP-abhängige Reduktion der PCB-vermittelten verstärkten Antworten kann dadurch erklärt werden, dass vorallem die P2Y-Rezeptoren an die Guanylatzyklase koppeln.

Die beiden zyklischen Nukleotid-Derivate triggern ausserdem eine Vielzahl von Ionenkanälen für monovalente Kationen, vorallem Kaliumkanäle (Partridge et al. 1990, Nuttle, Dubyak et al. 1994). Bei deren beschleunigtem Abbau durch die Phosphodiesterasen bzw. inhibierter Generierung durch Adenylat- und Guanylatzyklase kann es zu einer Verschiebung des Kationenhaushaltes in den Makrophagen und damit zur Zellschwellung kommen, die nach PCB-Vorinkubation beobachtet wird. Die wurde aber nicht weiter verfolgt. Für eine exakte Aussage, ob eine der Phosphodiesterasen, Calcium-Calmodulinkinase oder ein anderes System direktes PCB-Target ist, müsste das betreffende Enzym in Reinform in zellphysiologischen Konzentrationen auf Inhibition durch PCB hin getestet werden.

Das Expressionsmuster an Phosphodiesterasen bei Makrophagen in Kultur ändert sich (nach Gantner et al., 1997 und 1999) im Verlaufe von zwei Wochen. Während nach Aufreinigung der Zellen überwiegend PDE 3 und 4 vorherrschen sind, ist nach etwa einer Woche fast ausschließlich die cAMP-abhängige Phosphodiesterase 1 vorhanden. Das erklärt möglicherweise auch die unterschiedlichen Konzentrations-Effektkurven der in frühen Phasen der Kultur erhöhte cGMP-Suszeptibilität der P2Y-Rezeptoren. Unter 8-bromo-cGMP fallen die Antworten am P2_{UDP} und P2_{UTP} nämlich nahezu aus. Der Calcium-Calmodulinkinase-inhibitor KN-62 inhibiert nach Herstellerangaben der Firma Calbiochem den P2X₇-Rezeptor ab einer Konzentration von 10nM mit einem IC₅₀ von 100nM. Desweiteren ist KN-62 beschrieben als Inhibitor der CaCAMK II des Rattenhirns (und der Langzeitdepression, Schnabel, R. et al.) bis zu einer Konzentration von 10µM. In diesem Konzentrationsbereich hat KN-62-Applikation bei den Humanmakrophagen einerseits die beschriebenen inhibitorischen Effekte auf die benzoyl-ATP evozierte Calciumspiegeländerung, verringert aber bereits drastisch den basalen Calciumspiegel (Daten nicht gezeigt).

Wie sich im cAMP-EIA gezeigt hat, ist der PCB 47 verursachte inhibitorische Effekt auf die Adenylatzyklase durch 30 minütiger Vorinkubation mit dem Calciumcalmodulinkinase-Inhibitor zu

verhindern (nicht gezeigt). Der cAMP-Spiegel in den Zellen wird neben der Kontrolle der generierenden Adenylatzyklase-Systeme (über inhibitorische $G_i\alpha$ -Untereinheiten und stimulierende $G_s\alpha$ -Untereinheiten) zusätzlich seitens des Abbaus durch die CaCAMK-abhängige Phosphodiesterase I kontrolliert. Das PCB 47 führt hier also zu einem verringertem basalen cAMP-Spiegel durch Verringerung der Adenylatzyklasefunktion bei möglicherweise gleichzeitig unverändertem cAMP-Abbau durch vor allem die PDE I (die durch Isobutylmethylxanthin offensichtlich nicht erfasst wird), was eine Nettoverringerung des cAMPs bedeutet. Wird die Calciumcalmodulinkinase durch KN-62 blockiert, fehlt die Aktivierung der PDE I, die PCB-Inhibition fällt nicht mehr ins Gewicht, was auch die Calciumspektrofluorimetrie-Experimente mit dem Calciumcalmodulinkinase-Inhibitor belegen: nach KN-62 sind einerseits die rezeptorvermittelten Calciumspiegelerhöhungen verringert, nach zusätzlicher PCB-Vorinkubation nicht, wie nach PCB-alleine bei den erwähnten $P2X_7$ und $P2Y_{UTP}$ -Rezeptoren erhöht, sondern auf dem Basallevel. Die Blockade des PCB-Effektes durch den Calmodulinkinaseinhibitor KN-62 kann auf eine Verringerung der NOS-Funktion per se beruhen, da diese nur nach Calmodulinbindung aktiv ist. Das erklärte aber den fehlenden präventiven Effekt des KN-62 auf den cGMP-Level nicht.

Vorstellung der PCB 47-Wirkung in der Signalübertragung und im Stoffwechselgefüge bei Humanmakrophagen:

Nach Denninger und Marletta (1998) ist die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch das durch die Stickstoffoxydsynthese erzeugte NO gesichert. Die Aktivierung des Enzyms durch NO erfolgt am Hämteil des Proteins, das aus GTP zyklisches Guanosinmonophosphat erzeugt. Dieses wird einerseits durch Phosphodiesterasen abgebaut, aktiviert cGMP-aktivierbare unspezifische Kationenkanäle, aber auch einen cGMP-abhängigen Proteinkinase-Stoffwechselweg (PKG).

Ähnliches gilt offensichtlich für das durch die Adenylatzyklase aus ATP erzeugte zyklische Adenosinmonophosphat, cAMP.

Für die Aktivierung der Adenylatzyklase, die in neun verschiedenen Subklassen vorkommt (Bhalla und Iyengar, 1999), liegen keine gesicherten Daten zur Aktivierung durch Stickstoffoxyd vor, eine Hämbindung dieses Enzyms wurde bislang nicht beschrieben (Denninger, Marletta, 1998), ist aber Voraussetzung für NO-Wirkung am Enzym.

Die katalytischen Domänen der zytosolischen Guanylatzyklase und der Adenylatzyklasen sind ausgesprochen ähnlich, und unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäureresten, und können bei Punktmutationen dieser Aminosäuren das jeweilige andere zyklische Nukleotid synthetisieren. Wird die Guanylatzyklase durch NO aktiviert, katalysiert sie die cGMP-Entstehung aus Guanosintriphosphat, GTP.

Der cGMP-Spiegel wird physiologisch durch cGMP-spezifische Phosphodiesterasen kontrolliert (Gantner I-III, 1997 und 1999, Essayan, 1998).

Eine Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels durch cGMP kann auf drei verschiedenen Stoffwechselwegen erfolgen.

- (1) Einerseits gated cGMP direkt spannungsabhängige unspezifische Kationenkanäle und es kommt zu einer intrazellulären Erhöhung unter anderem von Calcium im Zytosol gezeigt für primär sensorische Afferenzen.
- (2) Über die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) kommt es zu einer Phosphorylierung von IP₃-Rezeptoren, die damit weniger sensitiv für ihren Liganden, Inositoltriphosphat, IP₃, werden. In glatten Muskelzellen nimmt dadurch der zytosolische Calciumspiegel ab und die Muskeln relaxieren (Denninger, Marletta, 1999).
- (3) Die Phosphodiesterasen 2,5 und 6 werden durch cGMP aktiviert, PDE 3 wird durch cGMP inhibiert. Auf der Ebene der PDE-Aktivierung konvergieren cAMP- und cGMP-abhängige Signalübertragungswege und führen durch Proteinaseaktivierung zu Phosphorylierungen verschiedener Proteine.

Diese cGMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert in der Folge (gezeigt für glatte Muskulatur) verschiedene Proteine, darunter auch Inositol-1,4,5 Triphosphat-Rezeptoren am (IP₃-Rezeptoren) am endoplasmatischen Retikulum, resultierend in einer Abnahme zytosolischen Calciums und verringerter Sensitivität der IP₃-Rezeptoren.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) gated ebenfalls durch Phosphorylierung spannungsaktivierbare Dihydropyridin-sensitive Calciumkanäle im Skelettmuskel, Hippocampusneuronen und am Herzmuskel (Rosenthal et al., 1988).

Für spannungsaktivierbare Calciumkanäle wurde ausserdem eine cGMP- bzw. cAMP-*unabhängige* Modulation nach rezeptorvermittelter G-Protein-Aktivierung gezeigt vorallem in sekretorischen Zellen, z.B. die Angiotensin II-induzierte Sekretion von Aldosteron eine Aktivierung von Calciumleitfähigkeiten und in neuronalen Zellen eine G-Protein-vermittelte *Inaktivierung* nach Noradrenalin, γ -Aminobuttersäure, Dopamin, verschiedenen Opioiden, Acetylcholin und Somatostatin (Rosenthal et al., 1988), die unabhängig von einer Verringerung zyklischen cAMPs sind.

Eine G-Protein abhängige Modulation von Ionenkanälen mit Calciumselektivität wurde auch gezeigt nach Aktivierung von purinergen P2-Rezeptoren (Rosenthal, 1988).

Eine G-Protein-vermittelte Inhibition der Proteinkinase C nach Aktivierung durch Phorbolster wurde ebenfalls beschrieben (Rosenthal, 1988) und ist vorallem im Zusammenhang mit dem PCB 47 mit in Betracht zu ziehen. Eine Calcium-abhängige Aktivierung der Proteinkinase C durch PCBs wurde von Kodavanti 1995 gezeigt (Mundy, Kodavanti, 1999). Über eine Aktivierung von IP₃-Rezeptoren auf dem Endoplasmatischen Retikulum kann auch der zytosolische Calciumspiegel

über einen Calciuminflux über der äusseren Zellmembran über die Calciumrelease-aktivierten Kanäle (Calcium release activated channels, I_{CRAC}) erhöht werden (Parekh et al., I, 1997).

Unter der Annahme, dass das PCB 47 die Stickstoffoxydsynthese inhibiert und nachfolgend den zytosolischen cGMP-Spiegel senkt, fehlen Veränderungen beim aus intrazellulären Speichern freigesetztem Calcium gegenüber den Kontrollen, wie in den Calciumentzugsexperimenten gezeigt.

Bei den PCB 47-Effekten an Humanmakrophagen ist die ATP-induzierte zytosolische Calciumerhöhung über veränderte Mechanismen des Calciumeintritts in die Zellen über der Extrazellulärmembran betroffen.

Inwieweit dabei eine Translokation der Proteinkinase C aus der zytosolischen inaktiven Form in die membranständige aktive Form betroffen ist, kann nicht beantwortet werden.

Wir haben gezeigt, dass die PCB-Exposition der Humanmakrophagen zu einer Inhibition der funktionellen Stickstoffoxydsynthese führt, in deren Verlauf es zu einer Verringerung an durch dieses Enzym produzierten NO_x in den Zellen kommt.

Das NO_x triggert an sowohl Guanylatzyklase als auch Adenylatzyklase die Entstehung des jeweiligen zyklischen Nukleotids. Ist das NO_x basal verringert, werden die basalen Spiegel an zyklischem cGMP und cAMP in den Humanmakrophagen gesenkt. Das wurde gezeigt sowohl für PCB 47 als auch für den iNOS-Inhibitor N^G -Amino-L-Arginin (NAA).

Für diesen Effekt des PCB 47 in Verbindung mit dem iNOS-Inhibitor NAA wurde ein klarer synergistischer Effekt auf die Verringerung des zyklischen cGMPs gezeigt.

Wir hypothetisieren daraus, dass in der Folge der verringerten cAMP- und cGMP-Entstehung in den Zellen auch die basale Aktivität der Proteinkinasen A und G (PKA und PKG) verringert sein muss.

Da die Funktion von IP_3 -Rezeptoren offensichtlich unverändert ist, wie durch die Calciumentzugsexperimente gezeigt wurde, und die Veränderung der ATP-Wirksamkeit vorallem Vorgänge in der Extrazellulärmembran betrifft, gehen wir davon aus, dass deren Phosphorylierungsgrad die ATP-auslösbare intrazelluläre Calciumerhöhung über der Extrazellulärmembran bestimmt und dass infolge der Verringerung zyklischen cAMPs und cGMPs die Phosphorylierung der Rezeptoren verringert ist.

Dadurch ist auch die Funktion der Calciumcalmodulinkinase betroffen:

diese wird normalerweise durch nach erhöhtem intrazellulären Calciumspiegel calciumbesetztes Calmodulin aktiviert. Eine Inhibition der Calmodulinkinase bleibt ausser bei einem ATP-Rezeptorsubtyp, dem $P2X_7$ -Rezeptor, ohne Effekt.

Da das PCB 47 akut zu keinem veränderten zytosolischen Calciumspiegel führt, sondern nur zu einer veränderten ATP-auslösbaren intrazellulären Calciumerhöhung, muss davon ausgegangen werden, dass die Calciumcalmodulinkinase durch das PCB nicht aktiviert wird.

Der PCB-Effekt ist aber bei allen Purinrezeptoren, deren Agonisten getestet wurden, durch den Calmodulinkinase-Inhibitor KN-62 blockierbar, also nach PCB 47 Behandlung der Zellen.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit KN-62 und nachfolgend PCB 47 verhindert eine Abnahme des zyklischen cAMPs in den Zellen, nicht aber des zyklischen cGMPs (Daten nicht gezeigt).

Die Level an zyklischen Nukleotiden sind kritisch für die durch ATP- oder dessen Derivate auslösbare intrazelluläre Calciumerhöhung: sind die Spiegel an zyklischen Nukleotiden hoch, ist die durch ATP-auslösbare intrazelluläre Calciumerhöhung signifikant verringert.

Sind die Spiegel an zyklischen Nukleotiden in den Zellen PCB (oder N^G-Amino-L-Arginin) abhängig verringert, ist die durch ATP auslösbare intrazelluläre Calciumerhöhung an bestimmten Rezeptoren signifikant erhöht.

5.1.9 beobachtete Effekte für die einzelnen, zu unterscheidenden Rezeptorklassen bei

Humanmakrophagen:

- (1) P2X₁/X₃-Rezeptoren: Vermutlich aufgrund seiner sehr schnellen desensitivierenden Eigenschaften mit Offendauer im Millisekundenbereich sind diese Rezeptoren in der Calciumspektrofluorimetrie mit einer Samplerate von fünf Bildern pro Minute kaum zu erfassen. Nach 8-bromo-cGMP, einem Inhibitor der PDE 4 ist die Antwort drastisch erhöht und verzögert. Diese Rezeptoren sind nicht in ihrer Agonisten-Stimulierbarkeit nach PCB 47-Vorbehandlung beeinträchtigt oder funktionell verändert. Die PCB-Behandlung wirkt sich nicht auf die Expression der Rezeptoren in der Kultur aus.
- (2) P2X₇-Rezeptor: Zeigt nach [100µM] PCB 47-Vorbehandlung über fünf Stunden eine erhöhte Agonistensuzzeptibilität gegenüber 20 und 50µM benzoyl-benzoyl-ATP. Die native Rezeptorantwort ist, wie auch die PCB-erhöhte, empfindlich gegenüber 10nM KN-62, einem Inhibitor unter anderem der *rattus norvegicus*- CaCAMK II.

Während die Agonisten induzierte Antwort nach PCB-Vorbehandlung sensitiv für 8-bromo-cAMP, einem cAMP-Agonisten ist, ist die Rezeptorantwort nicht anfällig für cGMP. Die Phosphodiesterase 1 wird durch Calcium-Calmodulin stimuliert. Das kann erklären, warum ein CaCAMK-Inhibitor zu einer weitgehenden Inhibition der Rezeptorantwort führt, die ihrerseits auch 8-bromo-cAMP-sensitiv ist.

Mir liegen keine Informationen darüber vor, ob die Calciumkalmodulinkinase bei der Regulation dieser Rezeptoren eine Rolle spielt, aber schließlich ist auch die iNOS cAMP-abhängig und moduliert die Calciumkalmodulinkinase.

Die Konzentrations-Effektbeziehung für benzoyl-ATP hat einen EC₅₀ von 56.32µM.

Die Rezeptorantwort ist ausgesprochen sensitiv gegenüber Phospholipase-Inhibitoren und der Rezeptor reguliert nach bereits kurzer Stimulation mit seinem Liganden die basale Expression der

iNOS runter, die selber in Bezug auf ihre Expression nicht PCB-anfällig ist.

Die Expressionsrate des Rezeptors in der Kultur steigt nach nur 5 stündiger Vorbehandlung mit 100µM PCB 47 um 7% an, was für einen genotoxischen Effekt des PCBs im Zusammenhang mit der Regulation dieses Rezeptors spricht. Nach einmaliger, kurzzeitiger Stimulation des Rezeptors erfolgt eine langandauernde Desensitivierung über bis zu 3 Stunden.

(3)UDP/UTP-abhängige Rezeptoren:

Nach direkt hintereinander gegebenen UDP und UTP-Stimuli in äquieffektiven Dosen ist die UTP-Antwort im Gegensatz zu der nach UDP PCB 47 sensitiv. Für diesen Liganden sind im Wesentlichen P2Y₂ und P2Y₄ Rezeptoren spezifisch.

Die UDP-Antwort ist zwar tendenziell erhöht nach PCB-Vorbehandlung aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle.

Die UTP-Rezeptoren sind empfindlich gegenüber cGMP-spezifischer Phosphodiesterase-Inhibition durch 8-bromo-cGMP nach PCB-Vorinkubation. Das gleiche gilt auch für 10nM KN-62 in Verbindung mit PCB, nicht aber für 8-bromo-cAMP.

UDP-spezifische Rezeptoren sind im Wesentlichen suszeptibel für die gleichen Inkubationen.

Laut Literatur sind die P2Y_{UDP} die nach IUPAC-Regeln neuerdings P2Y₆ genannten, hinter P2Y_{UTP} verbergen sich P2Y₂ und P2Y₄. Diese Rezeptoren desensitivieren unglücklicher Weise nach Liganden-Applikation innerhalb von etwa einer halben Stunde nicht. Appliziert man kurz hintereinander wiederholt UDP und UTP im Abstand von 8 Minuten, antworten einige Zellen wiederholt, andere nur einmal. Das bedeutet für die Durchführung der Experimente mit dem gewählten Design, dass Agonistenapplikation die betreffenden Rezeptoren nicht zwangsläufig ausknockt, sondern dass diese langandauernd ansprechen. Die Spezifität für UDP und UTP ist nicht völlig geklärt. So existieren auch sogenannte Uridin-Nukleotid-spezifische Rezeptoren, die bislang nicht geklärt und pharmakologisch daher nicht eindeutig beschrieben sind. Obwohl man zu den Expressionssystemen grundsätzlich sagen muss, dass nicht zwangsläufig mit dem exprimierten Rezeptor auch die Sekundärsysteme in den -meist Hamster- oder Xenopus-Oozyten- vorhanden sind und damit interaktive Aussagen zu solchen Zusammenhängen nur bedingt möglich sind.

(4) IBMX-sensitive Rezeptoren:

Isobutyl-Methylxanthin sensitive Rezeptoren sind von den beschriebenen vier verschiedenen P1A1, P1A2A und P1A3. Diese wurden durch keinen spezifischen Agonisten erfasst. Obwohl diese Rezeptorklasse nicht spezifisch für ATP ist, bieten diese, da gut charakterisiert, für die PCB-Studien gewisse Vorteile: alle drei IBMX-sensitiven Rezeptoren koppeln an die Adenylat-Zyklase, P1A_{2A} über G_s stimulierend, die anderen beiden über G_i inhibierend. Für die Studien hat man deshalb direkten Zugang zum cAMP-Spiegel (und IP₃ für P1A1 und A3) und über P1A1 an Kalium- und Calciumkanäle, aber ausser Adenosin keine spezifischen Liganden.

(5) ATP-sensitive Rezeptoren nach Applikation der Agonisten: Die durch die Agonisten-Screening-Experimente bei allen anderen Agonisten nicht erfassten Rezeptoren sind potentiell P2X_{2, 4, 5} und Y₆, sowie deren Heterodimere und P2Y₁ und Y₁₁. Diese sind insgesamt nicht PCB-sensitiv, wenn auch die Rezeptorantworten nach PCB/KN-62 gewissermaßen zusammenbricht. Das bedeutet, dass möglicherweise die Calcium-Calmodulinkinase an dieser Gruppe Rezeptoren eine funktionelle Rolle erfüllt. Die Antworten sind sensitiv für hohe Spiegel an zyklischen Nukleotiden, sowohl 8-bromo-cAMP und 8-bromo-cGMP verringern tendenzell, aber statistisch nicht signifikant, deshalb soll an dieser Stelle darauf nicht näher eingegangen werden. PCB in Kombination mit jeweils einem der zyklischen Nukleotide führt zu einer Antwort auf Kontrollniveau. Das bedeutet, dass der PCB-Behandlung die der Agonisten der zyklischen Nukleotide diametral gegenüber steht.

Rezeptor:	Spezifischer Ligand:	PCB-Beeinflussung:	PCB-Modulation cAMP-abhängig	PCB-Effekt cGMP-abhängig	PCB-Effekt KN-62-sensitiv	iNOS-regulierend	Kopplung an
P2X ₁ /X ₃	αβmeATP	nein	---	---	---	nein	
P2X ₇	bz-ATP	ja	ja	nein	ja	Ja, reguliert iNOS selber	PLD, NOS
P2Y ₂	UTP	nein	nein	ja	ja	nein	PLC, IP ₃
P2Y _{4,6}	UDP/UTP	ja	nein	ja	ja	ja	PLCβ (2), PLC, PLD, IP ₃ , NOS, PLA ₂ , Ca ²⁺
P1A ₁ , A _{2A} , A ₃	Adenosin	?	?	?	?	Ja (P1A ₁)	cAMP, PLA ₂
Alle anderen:	ATP	nein	nein	nein	nein	nein	---

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse an den durch Agonisten unterscheidbaren Rezeptorklassen hinsichtlich des PCB-Einflusses.

Das PCB-Target ist ein gemeinsamer Nenner für die Regulation der iNOS, Calcium-Calmodulinkinase und der cAMP/cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen, die wiederum die iNOS regulieren und durch sie reguliert werden. Das könnte auch erklären, warum Phospholipase-Stoffwechselwege, die über die Calcium-Entzugsexperimente mit erfasst werden, offensichtlich insensitive für das PCB sind, da die intrazelluläre Calciumfreisetzung unabhängig von der Adenylatzyklase erfolgt.

5.1.10 Scatchard-Analysen und Vergleich der Anpassungsmodelle für nicht-lineare Regression aller erstellten Konzentrations-Effektbeziehungen:

Bei der Analyse der linearisierten Scatchardauftragung ist die Voraussetzung der Gleichheit der Standardabweichungen nicht gegeben und bei der Interpretation daher Vorsicht geboten.

Interaktion des Fura-2 mit PCB 47:

Nach Edsall und Gutfreund ist eine Scatchardanalyse für Applikation eines extrazellulären Liganden im Zusammenhang mit Änderungen der Fluoreszenz (auch hervorgerufen durch intrazelluläre Calciumänderung) erlaubt, sofern ein direkter quantifizierbarer Zusammenhang besteht zwischen Anfangs- und Endpunkt der Messung, unabhängig von der Art und Zahl der Zwischenschritte.

Die linearisierte Auftragung der Konzentrations-Effekt-Beziehungen nach Scatchard liefert für die Kontrollen und PCB 47-Behandlungen der Humanmakrophagen jeweils zwei unterschiedliche Bindungsstellen mit einer hochaffinen und einer niederaffinen Bindungsstelle für ATP für jede Behandlung.

Während die beiden Assoziationskonstanten nach PCB 47 Vorbehandlung im Vergleich zur Kontrolle in etwa halbiert sind, ändert sich die absolute Zahl der niederaffinen Bindungsstellen im Gegensatz zu der der hochaffinen nicht und liegt im Bereich der B_{\max} -Werte der Anpassungen der nichtlinearen Regression der Kontrolle.

Demgegenüber ist die Zahl hochaffiner Bindungsstellen im Vergleich zur Kontrolle nach PCB 47 drastisch erhöht.

Die sigmoidale Anpassung der Konzentrations-Effektbeziehungen liegt zwar in dergleichen Größenordnung wie die Scatchardanalysen, erlaubt demgegenüber aber keine Anpassung mit zwei Bindungsstellen.

Insofern leistet die Scatchardanalyse der Konzentration-Effektbeziehungen etwas, was hyperbolische oder sigmoide Anpassung nach nicht-linearer Regression nicht vermögen: die quantitative Beschreibung verschiedener Bindungsstellen mit unterschiedlichen Assoziationskonstanten.

XAMR und XAMR/PCB-Vorbehandlung führen zum Wegfall der niederaffinen Bindungsstelle.

Da XAMR als Inhibitor aller P2Y-Rezeptoren beschrieben ist, kann man davon ausgehen, dass die niederaffine Bindungsstelle im Wesentlichen P2Y-Rezeptoren widerspiegelt. Deren Zahl ist nach PCB 47-Behandlung unbeeinflusst, aber die Affinität für ATP ist reduziert.

Das bedeutet, dass der PCB 47-Effekt im Wesentlichen die zellulären P2X-Rezeptoren betrifft, wahrscheinlich P2X₇-Rezeptoren.

Die nicht-linearen Anpassungsmodelle liefern nach XAMR höhere EC_{50} - oder K_A -Werte, aber keine

Veränderung der maximalen Zahl der Bindungsstellen, B_{\max} und sind insofern nicht verschieden von der Kontrolle.

Für XAMR in Verbindung mit dem PCB 47 zeigt sich eine Erhöhung der B_{\max} -Werte nach nicht linearer Regression und hyperbolischer Anpassung, eine tendentielle Erhöhung von B_{\max} nach sigmoider Anpassung, aber keine Veränderung der EC_{50} - oder K_A -Werte.

Die Scatchardanalyse liefert aber hier den Beleg, dass die Zahl der Bindungsstellen (P2X) im Vergleich zur XAMR-Behandlung ohne PCB 47 um etwa das zehnfache erhöht ist.

Nach PCB 77- Behandlung der Zellen verläuft die Konzentrations-Effekt-Beziehung zwar ähnlich der der Kontrollen, aber die Zahl der Bindungsstellen ist von zwei auf eine reduziert, die niederaffine nicht mehr vorhanden, während die hochaffine Bindungsstelle weitgehend identische Eigenschaften wie die Kontrolle aufweist.

Für den iNOS-Inhibitor N^G -Amino-L-Arginin (NAA) zeigen sowohl Scatchard-Analysen wie auch die Anpassungsmodelle für nicht-lineare Regression nur noch eine Bindungsstelle für ATP der Purinrezeptoren. Dabei ist der K_A -Wert der Scatchardanalyse bei $0.55/\mu\text{M}$, im Vergleich zu $9.38/\mu\text{M}$ in der hyperbolischen Anpassung und der EC_{50} -Wert $13.14 \mu\text{M}$ in der sigmoiden Kurvenanpassung. Das bedeutet, dass im Vergleich zur Kontrolle bei iNOS- Inhibition eine Bindungsstelle verschwindet.

Die Zahl der Bindungsstellen im Scatchardplot und in den nicht-linearen Regressionmodellen ist in der gleichen Größenordnung bei etwa 880 bis 1075.

Die Anpassungen nach PCB 47/NAA-Vorbehandlung zeigt sowohl in der Scatchardanalyse wie auch in der nicht-linearen Regression vergleichbare Anzahlen Bindungsstellen bzw. B_{\max} -Werte zwischen 425 bis 515, und nahezu identischen Werten in der nicht-linearen Regression für $K_A = 6,616$ und $EC_{50} = 6,34 \mu\text{M}$ nach hyperbolischer bzw. sigmoider Anpassung, aber einen verschiedenen K_A -Wert nach Scatchard.

Die Unterschiede sind möglicherweise durch nicht identische Varianzen zu erklären.

In Bezug auf die Kontrolle bedeutet das, dass PCB/ iNOS-Inhibition zum Verschwinden der niederaffinen Bindungsstelle für ATP auf den Makrophagen führt. Die Rezeptoren sind entweder nicht mehr vorhanden oder nicht mehr funktionell in der Lage, ATP-Bindung in eine zytosolische Calciumerhöhung umzusetzen.

In den Calciumzugsexperimenten (ATP ohne Calcium und ATP ohne Calcium/PCB 47) wird aus den PCB-behandelten Ansätzen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich, dass die Zahl der P2Y-Rezeptoren nicht verändert ist, da sowohl die B_{\max} -Werte der hyperbolischen Anpassung mit (303,9 versus 290,7) und der sigmoiden Anpassung (290,9 versus 301,0) nahezu identisch sind, als auch die K_A bzw. EC_{50} -Werte.

Statt zwei Bindungsstellen mit verschiedenen Affinitäten in Calcium-haltigem Ringer sowohl in Kontrolle und PCB 47 lassen sich die Kurven nunmehr durch eine Regression für eine Bindungsstelle anpassen, deren Affinität.

Der nicht-linearen Regression vergleichbare Werte liefern auch die Scatchard-Analysen, die sich in beiden Ansätzen nicht wesentlich unterscheiden.

Das bedeutet, dass die Zahl der an der Signalübertragung von P2Y-Rezeptoren, die zu einer intrazellulären Calciumerhöhung aus den Endokompartimenten führt, PCB 47-abhängig *nicht* verändert ist. Die Assoziationskonstanten zeigen aber, dass PCB 47 die Affinität der Rezeptoren für ATP etwa um 50% reduziert.

Im iNOS-Assay ist der EC_{50} -Wert für PCB 47 bei 81nM. Die B_{max} -Werte sind im vorliegenden Fall aber nicht sehr aussagekräftig, da die im RPMI-Kulturmedium enthaltenen basalen NOx-Level die Bindungswerte verändern und für diese Analyse rausgerechnet werden müssten.

Die weiteren zyklischen Nukleotidassays liefern im Scatchardplot für cAMP für PCB 47 eine N-Zahl von 2,3 (auch für PCB im Forskolinansatz) und 25,92 in den cGMP-Assays. Für den NOS-Inhibitor NAA liefert die Scatchardanalyse eine N-Zahl von 2,76 im cGMP-Ansatz und im PCB/NAA-Ansatz von 16,87.

Die Anpassung nach nicht-linearer Regression zeigt EC_{50} -Werte für die cAMP-Ansätze für PCB 47 von 585nM und NAA von 390 nM.

Die B_{max} -Werte sind insgesamt etwa eine 10er Potenz über den N-Zahlen der Scatchardanalysen.

Insgesamt gesehen liefern die lineare Datenanpassung nach Scatchard im Vergleich zu denen der nicht-linearen Regressionsmodelle teilweise vergleichbare Werte.

In den Kontrollen zeigen sich hoch und niederaffine Bindungsstellen. Die nach XAMR oder iNOS-Inhibition verbleibende Assoziationskonstante legt eindeutig eine Beeinflussung der P2X-Rezeptoren durch die iNOS und deren Inhibition mit in der Konsequenz verringertem cAMP-Spiegel durch das PCB 47 in den Zellen als den Mechanismus nahe, der zu einer veränderten ATP-Rezeptorfunktion führt.

Bewertung der Befunde:

Die wesentlichen Fragen nach dem Wirkmechanismus des PCB 47 sind zu beantworten für relevante Konzentrationen einerseits und funktionelle Aussagen auf Einzelzellebene des Menschen andererseits.

PCB 47 senkt den Level am zyklischen Nukleotid cAMP in den Humanmakrophagen. Dadurch wird die Funktion der UTP und bz-ATP stimulierbaren Rezeptoren hinsichtlich der Potenz des ATPs erhöht, was zu einem verstärkten Calcium-Einstrom führt.

Ein vergleichsweise erhöhter Agonisten-evozierter zytosolischer Calciumspiegel bei gleichzeitig verringerten zytosolischen cAMP-Spiegel könnte Konsequenzen für die Genexpression der Zellen haben, da einige Transskriptionsfaktoren, wie etwa die der CREB-Familie, sensitiv auf diese Parameter reagieren. Das zu Beginn der Versuche gewählte Konzept der Messung des zytosolischen Calciumspiegels zeigt, dass die PCB 47 verursachte Veränderung dieses zellulären Funktionsparameters mit einem EC_{50} (ATP) = 11.49 μ M nicht die eigentlich sensitive Variable der Makrophagen ist, sondern der Gesamtnitrit-Level und der cAMP-Spiegel, die beide PCB-abhängig mit IC_{50} - Werten von etwa 500 nM verringert sind. Insofern ist der Endpunkt ('Calcium-Regulation') bei den Humanmakrophagen nicht der tatsächlich sensitive, sondern ein in Relation zum zellulären Stoffwechselweg stehender Parameter.

Aus den Konzentrations-Effektbeziehungen für ATP-induzierte Calciumspiegeländerungen ist der NOEL des PCB 47 bei 20 µM. Dieser Wert spiegelt die tatsächlichen zellulären Stoffwechselfvorgänge unabhängig von Calcium-regulativen Prozessen aber offensichtlich nicht ganz wider: für die unstimulierte Veränderung des cAMP-Levels nach 5h PCB 47 ist der Level, bei

Purinrezeptoren:	P1-Rezeptoren:	P2-Rezeptoren:
	A ₁	Y ₁
	A _{2A}	Y _{1-like}
	A _{2B}	Y ₂
	A ₃	Y ₆
		P2X ₇ #

Rezeptoren für Hormone und biogene Amine:		
Adrenalin (β1- und β2-Rezeptoren, G _s , Glykogenabbau)	Follikelstimulierendes Hormon	Parathormon
Angiotensin	Glukagon	Serotoninrezeptor (G _s)
Calcitonin	Luteinisierungshormon	Thyroideastimulierendes Hormon
Choriogonadotropin	Lipotropin	Vasopressin
Corticotropin	melanozytenstimulierendes Hormon	
Endothelin	Noradrenalin	

Cytokine und Enzyme:		
IFN-γ	LPS induziertes TNF _α #	LPS (...)
Prostaglandine E 2, D 2, I 2	Collagenase (LPS+PGE 2*)	TNF-α #
MHC II #	" (LPS+dibuthyryl-cAMP*)	Makrophagen chemotaktisches Protein-1 #
IL-1β *	Ornithin-Decarboxylase (ODC)	

Tabelle 7: Purinrezeptoren, Hormone und Cytokine mit cAMP als zweitem Botenstoff (modifiziert nach Stryer, Ralevic/ Burnstock und Eisenstein/ Zwilling) oder deren Expression durch cAMP verringert (#) bzw. stimuliert wird (*) wird.

dem kein Effekt beobachtet wird, bei etwa 100nM, für Forskolin-stimulierte Vorgänge zeigt sich kein Effekt, für die Verringerung des Gesamtnitritspiegels sind die PCB 47-Konzentrationen im gleichen Konzentrationsbereich. Über ein bestimmtes Rezeptorprotein für das PCB kann noch nichts ausgesagt werden, der UTP-stimulierte Prozess ist aber, wie die KN-62-Ansätze zeigen, Calciumcalmodulinkinase-abhängig, und auch die Rezeptorfunktionen sind nach 5h PCB 47/ 30Minuten KN-62 stark eingeschränkt.

Zyklische Nukleotide erfüllen ubiquitär wesentliche Funktionen bei intrazellulären Signalübertragungswegen, etwa bei metabotropen, G-Protein-gekoppelten Prozessen und sind ebenfalls ein sehr genau über inhibitorische G-Proteine regulierter Parameter, aber auch wichtiger interzellulärer Botenstoff zellulärer Kommunikationsvorgänge, wie etwa bei der Syncytium-Bildung durch *Dictyostelium discoideum* (Stryer, Biochemie, S. 1013 ff.).

Die Inhibition von Signalübertragungswegen nach intrazellulär wird vorallem wesentliche Konsequenzen für Peptidhormone im Organismus haben (s.Tabelle 7).

Ist der cAMP-Spiegel akut oder gar evoziert verringert, fehlen nicht nur repressorische Signale für bestimmte Gentranskriptionen, wie etwa des P2X₇-Rezeptors (Humphreys, Dubyak, 1998, Eisenstein und Zwilling, 1994, Gantner et al., 1997 I), was auch die FACS-Experimente unterstützen, und verschiedener Zytokine, sondern die Signalübertragung von den Rezeptoren der Extrazellulärmembran nach intrazellulär ist gestört, was sich auch immunologisch manifestieren kann (s.Tabelle 7).

Strukturelle Ähnlichkeiten des PCB 47 mit aus der Literatur bekannten Aktivatoren oder Inhibitoren ergeben sich nicht unbedingt (Forskolin und Forskolin-Analoga, Cholera- und Pertussis-Toxin und Analoga).

Zu synthetischen rezeptorunabhängigen Adenylatzyklase-Aktivatoren gehört das Diterpen Forskolin und seine Derivate, die eine nahezu Steroidhormon-artige Struktur aufweisen und von denen man annimmt, sie aktivierten die Adenylatzyklase direkt an der katalytischen Untereinheit mit EC₅₀-Werten um 5 - 40 µM.

Kommerziell erhältliche Inhibitoren der Adenylatzyklase sind entweder Didesoxyadenosin-Derivate, wie das 2',5'-Didesoxyadenosin, das SQ 22536 (beides Purinderivate) oder ein strukturell den Prostaglandinen verwandter Stoff, das MDL-12,330A. Allerdings werden deren IC₅₀-Werte mit 100 bis 250 µM angegeben und sind damit Faktor 1000 über den hier relevanten Konzentrationen, ohne strukturelle Ähnlichkeiten mit den PCBs aufzuweisen.

Die Beurteilung verschiedener polyhalogener Substanzen, der TCDDs, PCDFs, PCBs und PBBs erfolgt nach dem Toxizitäts-Äquivalenzfaktoren-Konzept (TEF-Konzept).

Dieses legt die Arylhydrocarbonrezeptorbindung vermittelte Induktion der bei der Beurteilung der Toxizität der polyhalogenierten Verbindungen zu grunde. Der Messparameter ist die Ethoxyresurufin-Verstoffwechslung.

2,3,7,8 Tetrachlorodibenzodioxin, der stärkste bekannte Induktor der EROD-Aktivität erhält demnach die TEF-Bewertung 1, allen anderen Substanzen wird eine Toxizitäts-Äquivalenzzahl, die sich an der des TCDD orientiert, beigemessen.

Dabei auftretende Schwierigkeiten der Datenvalidierung, sei es durch die Problematik des Arbeitens mit Substanzgemischen, der unterschiedlichen intrinsischen Potenz eines PCBs im

Vergleich zum TCDD (oftmals Faktor 1000) bei gleichzeitig zu überprüfender Reinheit einer Probe (PCBs können nach dem Herstellungs-verfahren mit TCDD verunreinigt sein, dann reichte 1‰ Verunreinigung aus, um TCDD-Effekte zu messen), speziesspezifische Unterschiede oder Intraspezies- Unterschiede und die oftmals sehr unterschiedliche Umwelt- und Spezies-Persistenz sind hinlänglich bekannt, um Übertragbarkeitsfragen auf den Menschen guten Gewissens schlicht nicht klärbar erscheinen zu lassen.

Die Beurteilung von PCBs nach dem Toxizitäts-Äquivalenz-Konzept (TEF) setzt einen dem des Tetrachlorodibenzodioxin-ähnlichen Wirkmechanismus voraus (Kommission 'Humanes Biomonitoring', UBA, 1999, Stoffmonographie PCB). Dieses Konzept gilt jedoch nur für:

- * PCBs mit Ah-Rezeptor vermittelten toxischen Wirkungen, die dem TCDD vergleichbar sind
- * PCBs, deren Wirkungen streng additiv sind, was aber bei Gemischen keineswegs immer der Fall ist, da bei dioxinähnlichen PCBs auch antagonistische Wechselwirkungen mit TCDD und untereinander beobachtet werden (s. Einleitung)
- * dioxinähnliche Wirkungen das wesentliche Wirkprinzip darstellen, obwohl die meisten PCBs ein wesentlich größeres Wirkungsspektrum aufweisen (s. Ergebnisteil)
- * Gewebe, die diesen Rezeptor überhaupt exprimieren.

Die Kriterien zur Beurteilung und für eine wissenschaftliche Akzeptanz von Toxizitäts-Äquivalenzfaktoren (nach Neubert et al. und Koss, G. in: Marquart/Schäfer, 1997) bzw. nach dem Toxizitäts-Äquivalenzfaktoren-Konzept in Relation zur Toxizität von TCDD bzw. koplanaren PCB-Kongeneren sind beim PCB 47 nicht gegeben, da

- (1) der Mechanismus des PCB 47 nicht AH-Rezeptor-vermittelt
- (2) in einer humanen Mastzelllinie (Voie/Fonnum, 1998) akut die Calciumhomöostase über Inhibition der Calcium-Sequestrierpumpen stört
- (3) in bovinen chromaffinen Zellen und Neuronalen Zellen akut über Nifedipin-sensitive Prozesse die intrazelluläre Calciumregulation stört, was in Humanmakrophagen nicht der Fall ist, sondern
- (4) dort in einem sehr geringen Konzentrationsbereich den zytosolischen NO/cAMP-Spiegel verändert, mit völlig anderen zellulären Konsequenzen und damit
- (5) in verschiedenen Organen verschiedener Spezies die organotropen Manifestationen unterschiedlich sind
- (6) diese Vorgänge bei Substanzgemischen wesentlich komplexer sind und man vorhersagen kann, dass
- (7) die für verschiedene PCB-Kongeneren zu beobachtenden Mechanismen und die Wirkung orthochlorierter versus koplanarer PCB-Kongeneren auf keinen Fall streng additiv sein kann und ist (vgl. Stereospezifität der PCB-Wirkungen in der vorliegenden Arbeit).

Vor allem für mono- und diorthochlorierte PCBs ist vielfach geringe AH-Rezeptorbindung bei gleichzeitig hoher Neurotoxizität vor allem in Bezug auf Synthese und Freisetzung von Transmittern durch dopaminerge Neurone und chromaffine Zellen oder die Veränderung von Calciumströmen über GABA_A-Rezeptoren während der Entwicklung in Rattencortexneuronen beschrieben (Shafer et al., 2000).

An diesem recht einfachen und drastischen Beispiel sollte deutlich werden, dass AH-Rezeptor-Bindung alleine kein allgemeingültiger Meßparameter für die PCB-Toxizität, vor allem in Bezug auf den Menschen, sein kann. Erstens, da man annehmen muss, dass der Arylhydrocarbon-Rezeptor in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert wird und zweitens die Expressionsraten in Humangewebe vielfach nicht bekannt sind. Drittens ist zu fordern, dass die Affinität zu anderen Proteinen für die PCB-Wirkung in Geweben entscheidend sein wird, die diesen Rezeptor nicht exprimieren. Viertens ist der Rezeptor zytosolisch exprimiert, wie aber aus verschiedenen Experimenten mit chromaffinen Zellen und anderen Zellarten deutlich wird, sind verschiedentlich Nifedipin-sensitive Vorgänge der Extrazellulärmembran betroffen, das heißt, das PCB kann bereits vor der Ebene des Arylhydrocarbonrezeptors agieren, daher können andere Konzentrationen relevant sein, als die der Affinitäten der AH-Rezeptorbindung.

Mögliche Kanzerogenität der PCBs ist sicher das ausschlaggebendste Beurteilungskriterium der Einstufung. Dabei ist das naheliegendste Konzept die Überprüfung der Proteininduktion.

Nun ist sicherlich nicht jedes Protein AH-Rezeptor-vermittelt induzierbar, oder der Zellzyklus modifiziert, darauf gründet sich derzeit aber die gängige Beurteilung, mit weitreichenden Konsequenzen. Potentiell sind schlicht akute Disruptionen des Calciumlevels in der Lage, neben der Neurotransmitterfreisetzung, Calcium-abhängige Gene zu induzieren, dann ließe man sich allerdings auf die Diskussion eines zellulären Status' ein, was als toxikologischer Endpunkt ungeeignet ist.

Um eine allgemeingültigere Aussage zu erzielen, könnte man, um auch membrangebundene Vorgänge einzubeziehen, gängige ubiquitäre Signalübertragungssysteme, vor allem aber eine Verschiebung in deren funktioneller Ansprechbarkeit, berücksichtigen oder organunabhängige Parameter testen, wie die Veränderung diverser Haushaltsgene.

Insgesamt ist eine **gesicherte Beurteilung des PCB 47 in Bezug auf den Menschen nach dem TEF-Konzept nicht möglich** und daher abzulehnen.

Relevanz der Makrophagenbefunde für eine Risikoabschätzung:

Diorthochlorierte PCB-Kongenere werden in menschlichen Matrices praktisch nicht nachgewiesen (Bergmann et al., 1994). Daraus abzuleiten, sie seien für toxikologische Fragenstellungen in Bezug auf den Menschen nicht relevant, ist nicht ohne weiteres zu rechtfertigen, da diese in technischen Gemischen durchaus in bedeutsamen Konzentrationen enthalten sind und auch in Matrices von Nutztieren in nachweisbaren Mengen zu finden sind (Mitteilung XIII der Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln, DFG, 1988). Dabei sind für die Beurteilung der Expositionsabschätzung des Menschen 'carry-over-Faktoren' grundlegend, die letztlich die Bioverfügbarkeit, die Kompartimentierung, die Stabilität, Verteilungsvolumina, die Kinetik und somit die Toxikokinetik berücksichtigen.

Der 'carry-over-Faktor' wird als Quotient gebildet aus Menge PCB im Futtermittel pro Menge PCB in einer entsprechenden Nutztiermatrix, als dimensionslose Größe.

Die Kanzerogenität von PCB 47 ist im Gegensatz zu koplanaren PCBs praktisch nicht von Bedeutung. Im Ames-Test an Rattenleberzellen ist dieses Kongener nicht mutagen, Langzeittests wurden allerdings nicht durchgeführt.

Bei der Beurteilung der Kanzerogenität ist gemäß des drei Phasen-Modells der Kanzerogenese eine tumorinitiierende Wirkung von einer tumorpromovierenden Wirkung streng abzugrenzen. Bei PCB 47 wird zwar keine initiierende Wirkung an der Rattenleber beobachtet (präneoplastische Foci entstehen nicht) (Rose et al., 1985, *polychlorierte Biphenyle*, DFG), aber durchaus eine signifikante tumorpromovierende Wirkung nach Induktion durch Dinitrosamin: Nach Tests der promovierenden PCB-Wirkung einiger Kongenere neben PCB 77 mit starker Inzidenz, wurde in wöchentlicher Applikation 58-116mg/kg PCB 47 verabreicht. Dieses zeigt eine signifikante Tumorpromovierende Wirkung nach Dinitrosamininduktion (8mg/kg). In anderen Untersuchungen bei 100mg/kg im Futter wirkte PCB 47 etwa 10fach stärker als PCB 49. Diejenigen PCB-Kongenere, die Induktionsfähigkeit von Enzymen und Lebervergrößerung haben, zeigen auch meist eine tumorpromovierende Wirkung. PCB 47 führt zur Porphyrie in der Leberzellkultur. Desweiteren ist für viele PCB 47 beinhaltenden Gemische vorallem in verschiedenen Mausstämmen keine veränderte Makrophagenfunktion beschrieben, das heißt, Immunfunktionstests (SRBC-Test, 10, 100 und 250mg/kg Aroclor 1242 an die Muttertiere führen nicht zu veränderten Immunfunktionen der Nachkommen, 1254), 5 bzw 100 mg/kg über 18 Wochen hat kein Einfluss auf die Makrophagenaktivität (Phagozytose und Keimabwehr), hingegen führt 1248 (1g/kg, 5 Wochen) zu einer erhöhten Empfindlichkeit für Endotoxin, generell ist die Empfindlichkeit für Sekundärinfektionen erhöht.

Damit gilt PCB 47 potentiell bei den hier relevanten Konzentrationen auch für den humanen Organismus durchaus Beispielkongener der tumorpromovierenden Wirkung der niederchlorierten Dichlorbiphenyle, von denen einige auch zu den Induzieren vom gemischten Typ gehören, ohne

allerdings damit automatisch in Versuchstierorganismen Tumorinzidenzen ohne Initiation zu zeigen.

Referenzwerte für Humanexposition durch PCBs in verschiedenen Matrices und tägliche Aufnahme:

<i>Vollblut:</i>	<i>µg/l</i>	<i>Humanes Fettgewebe:</i>	<i>Frauenmilch:</i>	<i>Tägliche Aufnahme:</i>
				90% der Aufnahme erfolgt über die Nahrung (tierische Lebensmittel) Nur etwa 10% werden direkt wieder ausgeschieden
PCB:	## [µg/l]:	[µg/kg]:	3µg/kg KG, gestillte Säuglinge 0.55-0.88 mg/kg Fett, X _M = 0.67 (Milch, 1994) [mg/kg Fett] ()...PCB-Referenzwerte im Vollblut	[µg/kg]: 0.02-0.05µg/kg <u>Lebensmittel:</u> Rindfleisch: 20µg/kg Milchfett: 10µg/kg Schweinefleisch: 10µg/kg Fische: 2 – 20µg/kg Pflanzen: 2 µg/kg
28#	n.n.	n.n		
49..	n.n.	n.n		
52#	n.n.	n.n		
101#		9.0		
138#	0.8 - 1.8	257-3649	0.27' (0.20)	
153#	1.0 – 3.0	86-3703	0.34' (0.30)	
156.		11-253		
170..		31-803		
180#	0.7 – 2.2	55-3398	0.18' (0.70)	
189...		5-19		

Tabelle 8: Referenzwerte für PCBs in Humanmatrices und tägliche Aufnahme

* diorthochlorierte PCBs, Induzierer vom Phenobarbitaltyp

** monoorthochlorierte PCBs, Induzierer vom gemischten Typ

*** koplanare PCBs, Induktion Ah-Rezeptor-vermittelt, TCDD-Typ

PCB-Leitkongenere

Referenzwerte im Plasma etwa doppelt so hoch, der erste Wert bezieht sich auf 18-25 jährige, nachfolgend pro Dekade um jeweils 0.3 bis 0.5 µg/l altersabhängig zunehmend

' 95% Percentile, N = 1757 Stichproben

nn nicht nachweisbar

NOEL, LOEL, NOAEL aus Human-Biomonitoring-Werten sind derzeit noch nicht ableitbar, da noch keine abgesicherten Befunde zur Konzentrations-Effektbeziehung dieser Kongenere im Niedrigdosisbereich am Menschen vorliegen.

Das gleiche gilt für Referenzwerte der niedrigchlorierten PCB-Verbindungen, die üblicherweise in den höchsten Konzentrationen in der Innenraumluft vorkommen, aber aufgrund ihrer schnellen Verstoffwechslung im Menschen analytisch nicht nachweisbar sind.

Bei einer Resorptionsquote über die Lunge von etwa 50% gelten die in der Raumluft relevanten Mengen 300ng/m³ bis 3000ng/m³ PCB als Eingriffswert, die Expositionswerte befinden sich in der Regel im Bereich unter 100ng Gesamt PCB/m³ und werden lediglich bei Gebäuden älterer Bausubstanz überschritten.

Für den Menschen sind, mit Ausnahme der arbeitsbedingt besonders exponierten Personen, Belastungen im wesentlichen über die Nahrung umweltmedizinisch relevant im Bereich der Hintergrundwerte. Die Menge der PCBs in verschiedenen Organen ist beim Menschen in Milz, Thymus, Leber, Körperfett, Haut, Blut und Knochenmark pro Fettgehalt annähernd gleich.

Aus den Mengen der im Blut, Fett und der Frauenmilch gefundenen PCB-Leitkongenere, also für PCB 101 9 µg/kg Fett, PCB 138: 270 µg/kg Fett und PCB 153: 300 µg/kg Fett, läßt sich kaum ein Rückschluss auf die Exposition mit niederchlorierten PCBs ziehen.

Daher ist es außerordentlich schwierig, für PCB 47 auszusagen, ob eine relevante Exposition des Menschen überhaupt stattfindet, zumal das TEF-Konzept die unterschiedlichen Metabolisierungsraten der PCBs nicht berücksichtigt und eine Cytochrominduktion nicht mit Toxizität gleichzusetzen ist.

Die tägliche Aufnahme Gesamt-PCB befindet sich bei 0.02µg/kg Körpergewicht, d.h. bei einem Durchschnittsgewicht eines Erwachsenen von 75kg (bei Frauen vermutlich etwas weniger) beträgt die tägliche Gesamtaufnahme 150 ng.

Was davon anteilig auf das PCB 47 entfällt, läßt sich praktisch nicht abschätzen, da die Zusammensetzung, wie sie in den Ursprungsgemischen vorliegt, nur im Sediment, Boden, Schlamm und Wasser zu finden ist. Bereits in den Nutztieren findet Metabolisierung statt, was in erster Linie niederchlorierte Kongenere betrifft. Man kann also aus den Erkenntnissen der PCB-Metabolisierung in Nutztieren bereits vorhersagen, dass eine PCB 47-Aufnahme über die Nahrung aus tierischen Fetten für den Menschen keine Rolle spielt.

Die PCB-Gesamtwerte in pflanzlichen Matrices befinden sich bei etwa 2µg/kg. Mir liegen keine Daten darüber vor, wie die Metabolisierungsraten bei Pflanzen sind und welcher Anteil von diesen 2µg Gesamt-PCBs dabei auf niederchlorierte PCBs entfällt.

Mit EC₅₀-Werten des PCB 47 auf den cAMP-Spiegel von 500nM, also 146µg/l PCB 47, der Humanmakrophagen ist man bereits im Bereich der Konzentrationen der Leitkongenere der PCBs, die in humanen Matrices gefunden werden (Umweltbundesamt, 1999, I und II).

Da allerdings der Anteil niederchlorierter PCBs in den Arocloren nach den Herstellungsverfahren geringer sind als die der meisten Leitkongenere (s. Tabelle 8 und Anhang), befindet man sich auch innerhalb der Expositionsgrenzen bereits eine bis zwei Zehnerpotenzen unter den Konzentrationen

der höherchlorierten PCBs.

Die meisten Gemische der Aroclore mit geringerem Chlorierungsgrad (1016, 1232, 1242, 1248) enthalten zwischen 1 und 2 % PCB 47.

Würden diesen unmittelbar, wie etwa bei Arbeitsplatz-bedingter Exposition in Altanlagen, in Altbauten, oder im noch produzierenden Ausland auf den Menschen einwirken, kann man eine tägliche Aufnahme allein diesen Kongeners von 1.5 bis 3 ng/Tag vorhersagen.

Hohe PCB-Level finden sich in der Umwelt vorallem im Klärschlamm (100-1000µg/kg), Boden (10-200µg/kg) und durch Auswaschungen und Ausbringung von Klärschlamm als Bodendünger auch in den Gewässern (5-100ng/l), im Sediment (5-500ng/l).

Die über die Nahrung zu erwartende Exposition über tierische Fette, wie Rindfleisch (20µg/kg Gesamt-PCB), Milchfett (10µg/kg), Schweinefleisch (10µg/kg) und Fisch (2 bis 20µg/kg) liegt aber metabolisierungsgemäß darunter.

Somit kann man davon ausgehen, dass die hier gezeigten PCB 47-Wirkungen auf das Stoffwechselgefüge bei Humanmakrophagen Modellcharakter haben.

Basale PCB-Spiegel im Präparationsblut wurden nicht bestimmt, obwohl diese für die vorliegende Arbeit möglicherweise ein gutes Korrelat für Hintergrundexpositionen gewesen wären, da es den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt haben würde.

Es ist wahrscheinlich, dass die hier beschriebenen Effekte des PCB 47 Auswirkungen auf den funktionellen Status des Immunsystems im Allgemeinen und der Makrophagen im Speziellen haben können. Das ist zumindest denkbar für inflammatorische Prozesse, die nach Endotoxin angestoßen werden und in einer Freisetzung proinflammatorischer Cytokine und gesteigerter NO-Generierung münden.

These der PCB 47-Wirkung bei Humanmakrophagen:

These:
erhöhter ATP-induzierter
Calciumeinstrom
(stereospezifisch für 5h
diorthochloriertes PCB 47)

Antithese:
erhöhter ATP-induzierter
Calciumeinstrom nach Stickstoff-
oxydsynthese-
Inhibition

Synthese:
veränderte Purinrezeptorfunktion
beruht auf Änderung an iNOS

iNOS-Expression durch
PCB 47-unverändert

NO-Spiegel in den Zellen
PCB 47 konzentrationsabhängig
verringert

Synthese:
funktionelle iNOS-Inhibition
verringert ATP-Rezeptorfunktion

cGMP-/cAMP-Agonisten
verringern Funktion fast aller
Purinrezeptoren

PCB 47-Vorinkubation und cGMP-/cAMP-
Agonisten führen zu normalen
bis verstärkter ATP-Rezeptorfunktionen

Synthese:
PCB 47 führt über eine verringerte
iNOS-Funktion zu verringerten Spiegeln an
zytosolischen Leveln an zyklischen Nucleotiden

zytosolischer cAMP-Spiegel nach
PCB 47 verringert

zytosolischer cAMP-Spiegel nach iNOS-
Inhibitor verringert

Synthese:
PCB 47 verringert cAMP-Spiegel über iNOS-
Inhibition

zytosolischer cGMP-Spiegel nach
PCB 47 verringert

zytosolischer cGMP-Spiegel nach
iNOS-Inhibitor verringert

Synthese:
PCB 47 verringert cGMP-Spiegel über iNOS-
Inhibition

Calciumfreisetzung aus
intrazellulären Speichern durch
PCB 47 unbeeinflusst

Calmodulinkinaseinhibitor verhindert
Verringerung der zytosolischen cAMP-
Spiegel durch PCB 47

Synthese:
PCB 47 blockiert die Synthese zyklischen cAMPs
und cGMPs durch Adenylatzyklase und lösliche
Guanylatzyklase durch iNOS-Inhibition ohne Beeinflussung
der IP₃/Proteinkinasen kontrollierten intrazellulären Calciumfreisetzung
aber über eine Sensitivierung der Purinrezeptoren der Extrazellulärmembran

schematische Darstellung der These der PCB 47-Wirkung bei Humanmakrophagen:

- (1) PCB 47 führt zu einer Verschiebung der ATP-Effektivität bei den Makrophagen, eine zytosolische Calciumerhöhung hervorzurufen, die Purinrezeptor-gebunden ist
- (2) eine ähnliche Verschiebung zeigt sich für den iNOS-Inhibitor N^G-Amino-L-Arginin
- (3) PCB- und Stickstoffoxydsynthaseinhibitor-Effekte sind durch Gabe eines NO-Donors aufzuheben.
- (4) Die Expression der iNOS ist unverändert
- (5) Calciumzugsexperimente zeigen ohne und mit PCB-Vorbehandlung die gleiche Konzentrations-Effektbeziehung, sodass Phospholipase-abhängige Calciumfreisetzungsvorgänge aus intrazellulären Speichern nicht betroffen sind und die PCB-verursachte verstärkte intrazelluläre Calciumerhöhung nach ATP von extrazellulär kommt.
- (6) Eine ATP-Rezeptorfunktionsverringeringung kann für bestimmte Familien von ATP-Rezeptoren durch erhöhte zytosolische Spiegel an zyklischen Nucleotiden gezeigt werden.
- (7) PCB-Applikation und erhöhte Spiegel an zyklischen Nucleotiden führen zu normalen Rezeptorfunktionen.
- (8) Die zytosolischen Nucleotidspiegel sind verringert bei Inhibition der Stickstoffoxydsynthase.
- (9) PCB 47 inhibiert die funktionelle Stickstoffoxydsynthase und führt dadurch zu verringerten Spiegeln an zyklischem cAMP und cGMP, dadurch sekundär zu verstärkter ATP-induzierter zytosolischer Calciumerhöhung
- (10) die PCB-Effekte auf die ATP-induzierte zytosolische Calciumerhöhung liegen etwa eine Zehnerpotenz höher [ab 10µM, signifikant ab 20µM PCB] als auf die zytosolischen Nucleotidspiegel [IC₅₀ bei 500nM, signifikant gegenüber der Kontrolle ab 5µM] und betreffen vorallem P2X₇- und P2Y_{2(4,6)}-Rezeptoren.

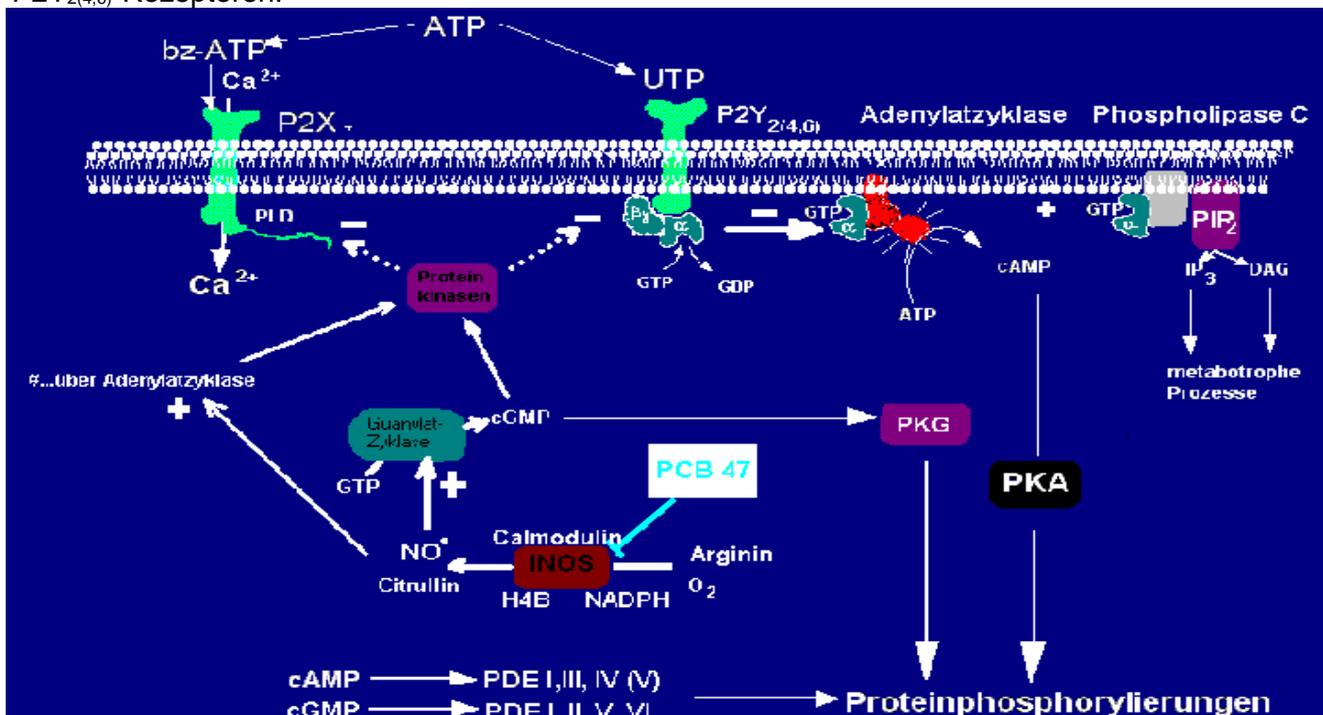


Abbildung 43: simplifizierte schematische Vorstellung der PCB 47-Wirkung bei Humanmakrophagen

ATP = Adenosintri-phosphat, bz-ATP = benzoyl-benzoyl-ATP, UTP = Uridintri-phosphat, Ca²⁺ = Calcium, GTP = Guanosintri-phosphat, PLD = Phospholipase D, AC = Adenylatzyklase, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, cGMP...zyklisches Guanosinmonophosphat, NO* = Stickstoffoxydradikal, PCB 47 = 2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl, iNOS = induzierbare Stickstoffoxydsynthase, H₄B = Tetrahydrobiopterin, N^G-Amino-L-Arginin = iNOS-Inhibitor, O₂ = molekularer Sauerstoff, NADPH = Nikotinadeninindinukleotidphosphat, PKA = Proteinkinase A, PDE I, III, IV, V = Phosphodiesterasen I, III, IV und V

Insgesamt führt PCB 47 innerhalb fünf stündiger Expositionszeit zu keiner akuten Veränderung des zytosolischen Calciumspiegels, sondern zur funktionellen Veränderungen bei Purinrezeptoren. Es kommt da-durch zu einer Nettoverschiebung cAMP-abhängiger Mechanismen hin zu Calcium-abhängigen Signalüber-tragungswegen ab relevanten PCB 47-Konzentrationen von etwa 500nM. Damit ist man im Bereich der nach Safe et al. (1998) beschriebenen Effektivdosen bei in vivo-Experimenten an Ratten, Kaninchen und Hamstern. Die Verringerung des zytosolischen cAMP-Spiegels ist zwar der als sensitivster bestimmter zelluläre Funktionsparameter, der nach PCB 47 verändert ist, zu bedenken ist allerdings, dass die funktionelle Beeinträchtigung der Adenylatzyklase auch auf veränderte Bereitstellung von Energieäquivalenten wie ATP durch die mitochondriale ATP-Synthase oder Quotienten der AMP+ADP/ATP-Spiegel im Energiehaushalt der Zellen von Bedeutung für den cAMP-Spiegel sein kann.

5.2 Parameter bei Chromaffinen Zellen:

Innerhalb sehr kurzer Zeit der Belastung der Zellen zeigt sich ein PCB-induzierter konzentrationsabhängiger Calciumeinstrom in der Spektrofluorimetrie. Dessen Konzentrationsabhängigkeit wurde bereits 1997 von Bickmeyer/ Messeri gezeigt für 20 bis 100µM PCB 47.

Nach kurzzeitigem Entzug des extrazellulären Calciums fehlt dieser jedoch vollständig, was auf einen Mechanismus im Bereich der äußeren Zellmembran schließen lässt und bereits von Kodavanti für PCB 2 (2,2' Dichlorobiphenyl) an cerebellären granulären Körnerzellen gezeigt wurde.

In Anwesenheit extrazellulärer Calciumionen ist dieser PCB-vermittelte Einstrom spezifisch durch das Dihydropyridin Nifedipin dosisabhängig blockierbar.

Da man den genauen Angriffsort des Nifedipins (Lüllmann, Mohr, S. 109) im Bereich der in Hotspots in der Zellmembran liegenden spannungssensitiven Calciumkanäle mit großer Leitfähigkeit der chromaffinen Zellen (s. Messeri, 1997) kennt, führte dies zu der Hypothese, das PCB 47 wirke an eben diesen Calciumkanälen.

In patch-clamp-Experimenten zeigt sich ebenfalls ein Einstrom über der Extrazellulärmembran mit ähnlichem Verlauf und ähnlicher Aktivierung bei konstant gehaltener Spannung, der durch Bariumionen getragen wird, die zur besseren Auflösung des Signals anstatt Calciumionen in der Lösung verwendet wurden.

Diese Beobachtung fehlt bei humanen, von Monozyten abgeleiteten Makrophagen, die nicht über dieses spannungssensitive Calciumporenprotein verfügen, wenn auch über Proteine, die in der Extrazellulär-membran zu einem kapazitivem Calciumeinstrom nach Freisetzung intrazellulären Calciums führen können, wie auch bei chromaffinen Zellen beschrieben (Lara et al.1997).

Diese Beobachtung ist offensichtlich korrelierbar mit dem Aktionsmuster des PCB 47, das, wie zuvor beschrieben, bei Makrophagen akut zu keiner zytosolischen Calciumveränderung führt.

Ein vollkommen differentes Aktionsmuster des PCB 47 ergibt sich bei bovinen chromaffinen Zellen. Nach akuter Exposition mit dem PCB steht eine intrazelluläre Calciumerhöhung über der Extrazellulärmembran innerhalb von etwa 4 bis 5 Minuten im Vordergrund, wie sich durch Calciumentzugsexperimente unter PCB zeigen lässt. Das kann bedeuten, dass das PCB 47 agonistisch an einem spannungssensitiven Ionenkanal seine Wirkung auf diesen Zellen ausübt.

Die nach Calciumentzug, PCB-Applikation und Resituierung des Calciums zu beobachtenden Oszillationen wurden an Neocorticalzellen der Ratte in ähnlicher Weise von Inglefield und Shafer (II, 2000) bei Exposition gegenüber Aroclor 1254 beobachtet. Diese konnten auf synaptische Vorgänge und excitatorische Neurotransmitter zurückgeführt werden und sind ebenfalls Nifedipin-sensitiv, treten aber spontan nach dem PCB-Gemisch auf und nicht erst, wie hier beobachtet, *nach* Restitution des extrazellulären Calciums. In den hier gezeigten Experimenten fehlen diese Oszillationen in den PCB 47-Ansätzen unter Anwesenheit extrazellulären Calciums.

Den sehr kurzfristigen Aspekten der PCB47- Wirkung bei chromaffinen Zellen steht ein auch bei längerer Inkubationszeit bis 5h und darüber gesteigerter Spontanrelease gegenüber. Laut Lehrmeinung ist ein evozierter Release stets an in die Zelle strömendes Calcium gebunden, während der spontane Release als calciumunabhängig erachtet wird, man experimentell aber in dem Dilemma steckt, dass man den Zellen nicht über mehr als fünf Minuten extrazellulär das Calcium entziehen kann.

Dem evozierten Release, wie etwa nach chemischer Depolarisation durch K⁺-Lösung extrazellulär geht ein in der Folge starker messbarer Calciumeinstrom voraus, was als einfache reversible Calciumerhöhung in der Calciumspektrofluorimetrie auch demonstriert werden kann, deren Reversibilität hier als zellulärer Funktionsparameter verwendet wurde. Fehlt diese zelluläre zytosolische Calciumänderung, führt eine 40 bis 50µM Kaliumlösung auch nicht zur Exozytose von Speichervesikeln (Neher et al. 1998, Lara et al. 1997, Lewis et al. 1997).

Das heisst, bei diesen neuronalen Zellen verwandten endosekretorischen Zellen existiert eine Calcium-Einstrom-Sekretionskopplung.

Demgegenüber zeigen chromaffine Zellen über einen längeren Zeitraum auch einen gewissen spontanen Release ihrer vesikulär gespeicherten Katecholamine, der im Vergleich zu dem evozierten gering ausfällt (Messeri 1997).

Während nach akuter PCB-Applikation innerhalb von dreißig Minuten die PCB-Aktionen weitgehend abgelaufen sind und auch in Daueranwesenheit von PCB extrazellulär der zytosolisch erhöhte Calciumspiegel nach etwa 15 Minuten wieder auf Basalwerte zurückgeht, zeigen die Zellen auch einen erhöhten Spontanrelease, entfernt man nach dreißig Minuten extrazellulär das Medium. Das bedeutet, der nachfolgend über mehrere Stunden signifikant erhöhte spontane Release von Inhalten der Speichervesikel ist offensichtlich nicht gebunden an extrazelluläres Calcium. Demgegenüber ist nach längerer Inkubationszeit mit PCB 47 der kaliumevozierte Catecholaminrelease signifikant verringert (Messeri, 1997).

Die Spannungsabhängigkeit ist negativ beeinflusst. Das demonstrieren die gezeigten Strom-Spannungskurven nach akuter PCB-Inkubation: die Amplituden der Strom-Spannungskurven sind signifikant verringert, während die Aktivierung bei etwa -40mV im Vergleich zu Kontrollen und DMSO-Ansätzen unverändert ist, und auch über die patch-Elektrode intrazellulär appliziertes PCB 47 [10µM] verändern diese nicht.

Bei fünf Stunden PCB-Inkubation ist die Amplitude im Vergleich zur Kontrolle erhöht, was angesichts der geringen N-Zahlen aber nicht von Bedeutung sein muss.

Die Membranpotentiale sind nur im fünf Stunden PCB-Ansatz deutlich geringer. Bei längerer Inkubation über 24 Stunden kommen die spannungsevozierbaren Bariumströme zum Erliegen. Das kann durch das ausgesprochen lipophile PCB zustande kommen, denn Giga-seals sind bei den so vorbehandelten Zellen ausgesprochen schwer zu erreichen.

Ob diese Ionenkanäle ausschließlich funktionell beeinträchtigt sind oder ihre Expressionsrate geändert hat, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Nach PCB 47-Inkubation ist akut die Spannungssprung-evozierbare maximale Stromamplitude verringert, das Membranpotential aber unverändert.

Bei fünf Stunden Inkubation (und Entfernung der potentiell im Medium zu erwartenden Katecholamine) sind Stromamplitude und Membranpotential erhöht.

Bei der Wahl eines anders zusammengesetzten Badmediums ist das Membranpotential im cell-attached-Modus verringert, der aber keine genaue Bestimmung des Potentials gestattet.

Ausgehend von diesen Beobachtungen standen in der Folge mechanistische Aussagen zum spontanen Release im Vordergrund.

Die bei den Humanmakrophagen beobachtete funktionelle Beeinträchtigung der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase könnte auch bei chromaffinen Zellen Grund für die veränderten Spontanfreisetzungsvorgänge sein, da NO_x offensichtlich bestimmte Ionenkanäle beeinflusst.

Verschiedentlich wurde eine funktionelle Inhibition von spannungsaktivierbaren Calciumkanälen durch nach Natriumnitroprussid erhöhte NO-Spiegel in RINm5F-Zellen gezeigt (Grassi et al., 1999). Diese Inhibition ist letztlich auf in der Folge erhöhte cGMP-Spiegel in diesen Zellen zurückzuführen. Umgekehrt könnten auch hier durch das PCB 47 verringerte cGMP-Level nach NOS-Inhibition zu einer veränderten Calciumkanalfunktion führen.

Eine Inhibition der neuronalen NOS führt bei den chromaffinen Zellen in der Tat zur einer Veränderung der Spontanrate der Katecholaminfreisetzung (nicht gezeigt).

Darüber hinaus sind aber spannungsaktivierbare Calciumkanäle vom L-Typ aber auch durch eine nNOS-Inhibition zu beeinflussen: während das Membranpotential der Zellen nach NOS-Inhibitor unverändert ist, ist die durchschnittliche spontane Offenrate spannungsunabhängig verringert, bei gleichzeitig deutlich erhöhter Offendauer, das heißt, Ionenkanäle mit Leitfähigkeit für Calcium sind nach NOS-Inhibition länger offen.

Dabei treten sehr lange Offenzeiten über 70ms wesentlich häufiger auf, als in Kontrollen und PCB-behandelten Zellen (nicht gezeigt). Das Gesamtintegral der Ereignisse/Minute x Offendauer ist um über 51% der Gesamt-Coulombzahl auf 0.73 versus 1.51pC (PCB 47: 1.56pC) reduziert.

Diese Beeinflussung zeigt sich nach PCB 47 definitiv nicht: im Gegensatz zu nNOS-behandelten Zellen ist die distinkte Verteilung der Offenraten und das Fehlen hoher Offenraten gewahrt, aber die in der cell-attached-Konfiguration messbaren Spontanöffnungen zeigen eine vergleichsweise hohe Anzahl sehr kurzer Öffnungen von 1 ms Dauer, der somit einen in der Calciumspektrofluorimetrie nicht detektierbaren Leckstrom in die Zellen an Calcium darstellt und der – rein hypothetisch- mit Auslöser für einen gesteigerten spontanen Release an Vesikeln über einen längeren Zeitraum PCB 47- Inkubation sein könnte, was zu beweisen war.

Das bedeutet, das zyklische Nukleotide, also cAMP und cGMP, bei den chromaffinen Zellen, eine

regulatorische Rolle für die Nifedipin-sensitiven Ionenkanäle spielen könnten, wie verschiedentlich gezeigt (Rosenthal et al., 1988), da e/nNOS-Inhibition (durch NPA) zu veränderten Spontanöffnungen der Einzelkanäle führt, dass hier das PCB 47 diese Stickstoffoxydisoformen aber wahrscheinlich unbeeinflusst läßt. Die Spiegel zyklischer Nukleotide in chromaffinen Zellen nach PCB 47 wurden nicht bestimmt.

Die Stickstoffoxydsynthase erfüllt insofern eine mitentscheidende Funktion, da eine Veränderung zellulären NO_x präsynaptisch zu einer Veränderung der Guanylatzyklasefunktion führt, die die cGMP-Spiegel erzeugt, welches wiederum bei Calcium-unabhängigen Prozessen entscheidend beteiligt ist.

Prinzipiell sind mehrere Möglichkeiten des erhöhten Neuro-humoralen Releases verursacht durch PCB 47, wie sie verschiedentlich beschrieben wurden, denkbar:

- * Synthese und Beladung der Vesikel mit Catecholaminen- Störung der Zellphysiologie auf **Golgi- und enzymatischer Ebene** (s. H.Herken, F. Hucho, Ed., 1992)
- * verstärkte Membranfusion und Ausschüttung nach Störung der intrazellulären Aufhängung/ des Cyto-skelettes - Störung auf Ebene des **Cytoskeletts**.
- * Veränderte Quantelung des Calciumeinstromes durch funktionelle Veränderung Calcium-abhängiger Vesikel-Release-Proteine (Synaptofusin, Synaptobrevin u.a.)-Störung der Zellphysiologie auf Ebene des **Cytosols**
- * eine veränderte Spontanöffnungsrate der Calciumkanäle, denn veränderte Physiologie nach PCB-Vorinkubation wurde vorallem beobachtet im spontanen Neurotransmitter- bzw. Catecholaminrelease, nicht aber für den durch Membrandepolarisation nach K⁺-Applikation auslösbaren evozierten Release- Störung der Zellphysiologie auf **Membranebene**.
- * Veränderte Expressionsrate von spannungsabhängigen Ionenkanälen- **genetische Schädigung** und indirekt auf Membranebene.

Gesamtbewertung:

Die PCB-induzierten Calciumänderungen bei chromaffinen Zellen erfordern extrazelluläres Calcium. Die induzierten Änderungen sind dosisabhängig durch den L-Typ- Calciumantagonisten Nifedipin blockierbar.

Der Vergleich der Raumstrukturen des Dihydropyridins Nifedipin und die des nicht-koplanaren PCB 47 offenbart strukturelle Ähnlichkeiten:

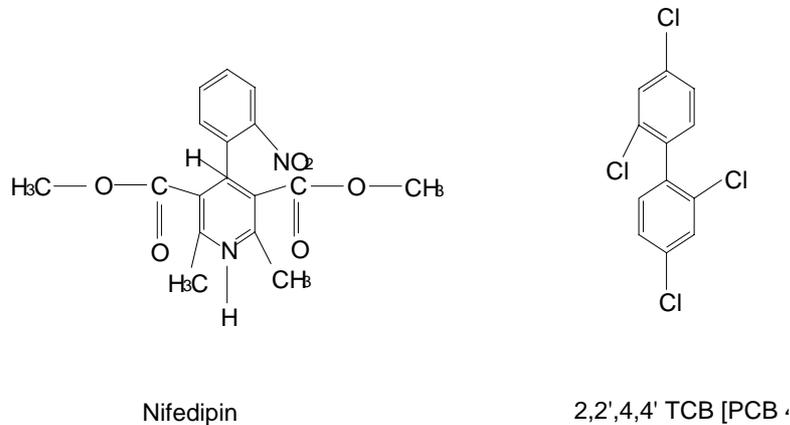


Abbildung 44 Anhang: Strukturvergleich zwischen Nifedipin und PCB 47. Die Phenylringe sind wegen der sterischen Anordnung gegeneinander verdreht. Möglicherweise hat das PCB agonistische Wirkung am L-Typ-Calciumkanal, denn die beobachteten Depolarisationen nach PCB sind induziert und erfordern extrazelluläres Calcium.

Die beschriebenen Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Induktion der Calciumströme mit einem Agonismus des PCBs an α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals bei chromaffinen Zellen zusammenhängt, während eine strukturell eng verwandte Dihydropyridin-Verbindung, Nifedipin bzw. PN 200-110 als Calciumantagonist hinlänglich etabliert ist und den spannungssensitiven Rezeptor blockiert.

Das PCB hat also bei chromaffinen Zellen die Wirkung eines *Calciumagonisten*.

Nach den Ansätzen mit dem Dihydropyridin Nifedipin und dem Calciumkanalblocker PN 200-110, einem Dibenzodiazol-substituierten Dihydropyridin ((+) -Enantiomer) belegen, dass das PCB 47 zu einem Calciumeinstrom bei chromaffinen Zellen durch Agonismus an der α_1 -Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals führt. Die in der Konsequenz dieser PCB-Aktionen zu erwartenden und bereits gezeigten akut gesteigerten Sekretion von Katecholaminen (s. Messeri et al. 1997) belegen zudem, dass PCB 47 neurotoxische Wirkungen entfalten kann, ohne zwangsläufig, wie für koplanare PCB-Kongenere beschrieben, an den intrazellulären Aryl-Hydrocarbonrezeptor gebunden zelluläre Systeme anzustoßen.

Auch bei chromaffinen Zellen hat das PCB 47 die Funktion der Verschiebung zellulärer Signalübertragung des Verschiebung hin zu Calcium-abhängigen Prozessen, aber mit der weiteren Konsequenz der Störung neuronaler zellulärer Kommunikation mit durch erhöhten Calciumeinstrom ausgelöste stark erhöhte Catecholaminfreisetzung, weitgehend unabhängig von einer möglichen Inhibition der neuronalen Stickstoffoxydsynthese.

Nach ersten vorläufigen Experimenten zeigt sich eine spezifische Bindung mit dem Nifedipin-Analogen PN 220-110, aber kein durch das PCB 47- verdrängbarer Mechanismus bei Konzentrationen bis 100µM. Damit muss diese Arbeitshypothese als nicht bestätigt betrachtet werden.

Bewertung der Aktionen des PCB 47 bei In-vitro-Modellen: auf Humanmakrophagen und nicht-humane endokretorische Zellen

Die Wirkungen des PCB 47 auf den Calcium-Haushalt boviner chromaffiner Zellen sind definitiv andere als bei Humanmakrophagen.

Bei gleichem Expositionsverlauf führt das PCB 47 innerhalb von 5 Minuten bei chromaffinen Zellen konzentrationsabhängig zu einem dramatischen, aber durch die Zelle kompensierbaren Calciumeinstrom und somit zu einer akuten Disruption der Calciumhomöostase, was bei Makrophagen nicht der Fall ist.

Calcium-Entzugsexperimente und Nifedipin-Sensitivität bei chromaffinen Zellen lassen einen vom extrazellulären Calcium abhängigen Mechanismus der äußeren Zellmembran am Dihydropyridin-Rezeptor vermuten.

6. Zusammenfassung:

(A) Humanmakrophagen: (1) Die ATP-induzierte zytosolische Calciumspiegeländerung ist PCB 47 konzentrationsabhängig und PCB stereospezifisch über der Extrazellulärmembran erhöht. (2) Die Konzentrations-Effektcurve für ATP in Bezug auf die zytosolische Calciumerhöhung zeigt einen EC_{50} -Wert von $4.04\mu\text{M}$ und erreicht ab $10\mu\text{M}$ ATP ein Plateau. Nach PCB 47 ist der ATP- EC_{50} -Wert rechtsverschoben auf $11.32\mu\text{M}$. Calciumzugsexperimente ohne und mit PCB-Vorbehandlung belegen, dass Mechanismen der äusseren Zellmembran betroffen sind, die aber durch (3) einen Antagonisten für purinerge P2Y-Rezeptoren, XAMR, spezifisch konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} von $0.5\mu\text{M}$ blockierbar sind. (4) Die funktionelle Inhibition der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase (iNOS) führt zu einer vergleichbaren Verschiebung der ATP-induzierten Calciumspiegeländerung: die Konzentrations-Effektbeziehung ist nach 1.5h Behandlung mit dem Argininderivat N^G -Amino-L-Arginin (NAA) ebenfalls verschoben und führt zu einem höheren zellulären Calciumlevel als in den Kontrollen nach ATP. In immunohistochemischen Studien zeigt sich keine veränderte Expression der induzierbaren Stickstoffoxydsynthase nach PCB-Exposition, die basal in den Zellen exprimiert wird. Das PCB 47 inhibiert die funktionelle iNOS, da die Funktionsverstärkung der Rezeptoren durch NO-Donation einerseits aufgehoben werden kann und andererseits in direkten NO-Bestimmungen eine Abnahme des zytosolischen Gesamtnitrat-Spiegels PCB-konzentrationsabhängig mit einem IC_{50} von etwa 500 nM erfolgt. (5) Agonisten spezifischer Purinrezeptorsubklassen zeigen, dass der PCB 47-Effekt die Funktion mindestens zweier verschiedener ATP-Rezeptorklassen verstärkt: des $P2_{bzATP}$ -Rezeptors ($P2X_7$) und der $P2_{UTP}$ -Rezeptoren. Am $P2X_7$ -Rezeptor ist diese Funktionsveränderung cAMP-Spiegel abhängig, am $P2_{UTP}$ -Rezeptor von cGMP. (7) Der Calcium-Calmodulinkinase-Inhibitor KN-62 in geringen Konzentrationen [10nM] inhibiert den PCB-Effekt und die Rezeptorfunktionen ohne Ausnahme an allen P2-Rezeptoren, auch nach Dibenzoyl-ATP und UTP. (8) PCB 47 verringert den zytosolischen Gehalt von cAMP und cGMP PCB-konzentrations-abhängig mit einem EC_{50} für cAMP = 586 nM, für cGMP erst ab höheren PCB 47 Konzentrationen $> 1\mu\text{M}$. Der durch Forskolin evozierte cAMP-Spiegel ist PCB- unbeeinträchtigt. Der Inhibitor der iNOS, N^G -Amino-L-Arginin (NAA), verringert ebenfalls cAMP-Spiegel ($IC_{50} = 394\text{nM}$) und cGMP-Spiegel ($IC_{50} = 500\text{nM}$). PCB 47/NAA gemeinsam führen zu cGMP-Werten im Attomol-Bereich, aber zum Zusammenbruch der ATP-Antwortfähigkeit in der Calciumspektrofluorimetrie. Insgesamt verschiebt das PCB zelluläre Funktionen hin zu calciumabhängigen Prozessen.

B: bovine chromaffine Zellen (1) PCB 47 verursacht ein akute Disruption der zellulären Calciumregulation über der Extrazellulärmembran, die (2) Nifedipin-sensitiv ist und damit auf eine PCB-verursachte Veränderung des hochspannungsaktivierten Calciumkanals mit großer Leitfähigkeit (L-Typ-Calciumkanal) zurückgeht. (3) Einzelkanalöffnungen mit sehr kurzer Offendauer treten signifikant häufiger auf. Die Inhibition der in diesen Zellen als konstitutiv exprimiert beschriebenen Stickstoffoxydsynthase führt (4) zu einer signifikanten Verringerung in Spontanöffnungsrate und bei bestimmten Offenzeiten.

7. Literatur:

- Adam, G., Läuger, P., Stark, G,** 1988: Physikalische Chemie und Biophysik, 2. Auflage, Kap. 5, 134-156, Springer Verlag, London, New York, Heidelberg, Tokyo, Berlin, Paris
- Alexander, S., MacKenzie, G., Peters, J., Lewis, S,** 2000: trends in pharmacological sciences (Tips) receptor and ion channel nomenclature supplement, 72-75
- Anane, D., Sanquer, S., Sébille, V., Faye, A., Djuranovic, D., Raphaël, J., Gajdos, P., Bellissant, E.,**2000: Compartmentalised inducible nitric oxide in septic shock
The Lancet **(355)**, 1143-1148
- Angus, G.R., Contreras, M.L.,**1996: Effects of polychlorinated biphenyls on dopamin release from PC 12 cells
toxicology letters **89**, 191 - 199
- Arbuzova, A., Murray, D.und McLaughlin, S.:** 1998: MARCKS, membranes and Calmodulin: kinetics of their interaction,
Biochim. Biophys. Act. **1376**, 369-379
- Artalejo, A., Garcia, A., Neher, E.,** 1993: Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} - Channels in bovine chromaffin cells,
Pflügers Arch. European J. of Physiol. **423**, 97 - 103
- Arzneimittelbrief, A 3200,** 01/1998, Jahrgang 32/1, 1998: Klinischer Einsatz rekombinanter hämatopoetischer Wachstumsfaktoren: Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (G-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (GM-CSF)
- Ashen, M.D., O'Rourke, B, Kluge, KA, Johns, DC; Tomaselli, G.F.,** 1995: Inward rectifier K^{+} -channel from human heart and brain: cloning and stable expression in a human cell line,
Am. J. Physiol. **268 (1Pt2)**, 506-511
- Ashner, M. et al.,** 1999: Glial cells in neurotoxicity development,
Annu. rev. pharmacol. toxicol. **39**, 151- 173
- Baker, P.F.,** 1988: Calcium in drug actions, handbook of experimental pharmacology, Springer-Verlag, London, Berlin, Tokyo, Vol. **83**, 310 - 357
- Banati, R.B. et al.,** 1991: A subpopulation of bone marrow derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia
J. of Neuroscience res. **30**, 593 - 600
- Beck, C.F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Meßmer, U.K., Mühl, H., Pfeilschifter, J.,** 1999: Inducible nitric oxide synthase: role in cellular signalling
J. exp. Biol., **202**, 645 - 653
- Benos, D.J. et al.,** 1994: Cytokines and HIV envelope glycoprotein gp 120 stimulate Na^{+}/H^{+} exchange in astrocytes,
J. Biol. Chem., Vol. **269 (19)**, 13811 – 13816

-
- Bergman, Å., Klasson-Wehler, E. Und Kuroki, H.,** 1994: Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood, *environ health perspect* **102**, 213-220
- Berridge, M., Bootman, M. and Lipp, P.,** 1998: Calcium- a life and death signal, *Nature* **395**, 645 - 648
- Beyer, E.C., Steinberg, T.H.,** 1991: Evidence that the gap junction protein connexin-43 is the ATP induced pore of mouse macrophages, *J. Biol. Chem.* Vol. **266 (13)**, 7971 - 7974
- Bezvenyuk, Z., Suuronen, T., Salminen, A., Solovyan, V.,** 2000: Protective effect of suramin against cell death in rat cerebellar granular neurons and mouse neuroblastoma cells *Neuroscience letters* (292), 111-114
- Bhalla, U.S. , Iyengar, R.,** 1999: Emergent properties of networks of biological signaling pathways *Science* Vol. **283**, 381-387
- Biber, K., Laurie, D. et al.,** 1999: Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia, *J. of Neurochemistry* **72**, 1671-1680
- Bickmeyer, U., Weinsberg, F., Müller, E., Wiegand, H.,** 1998: Blockade of voltage operated calcium channels, increase in spontane catecholamine release and elevation of intracellular calcium levels in bovine chromaffine cells by the plant alkaloid tetandrine *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (**375**), 441-445
- Borlakoglu, J. T., Drew, M.G.B., Wilkins, J.P.G., Dils, R.R.,** 1990: Effects of molecular substitution patterns on the cytochrome P-450-dependent metabolism of 2,2',3,5,5',6- and 2,2',3,4,4',6-hexachlorobiphenyl by rat liver microsomal monooxygenases, *Biochem. Biophys. Act.* **1036**, 167-175
- Brookes, P.S., Bolaños, J.P., und Heales, S.,** 1999: The assumption that nitric oxide inhibits mitochondrial ATP synthesis is correct, *FEBS letters* **446**, 261-263
- Brouwer, Abraham et al., Assessment,** 1995: Functional aspects of developmental toxicity of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in experimental animals and human infants, *European J. Pharm., env. pharm. sec* **293**, 1-40
- Buell, G. et al.,** 1998: Blockade of human P2X₇ receptor function with a monoclonal antibody, *Blood* **92 (10)**, 3521 - 3528
- Cario- Toumanianantz, C et al.,** 1998: Non-genomic inhibition of human P2X₇ purinoreceptor by 17 beta-oestradiol, *J. Physiol. Lond.,* **508 (Pt 3)**, 659 – 666

-
- Connor, K. et al.**, 1997: Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and anti-estrogens: structure-activity-relationship,
Toxicol. appl. pharmacol., **145 (1)**
- Dar, D.E. and Zinder, O.**, 1999: Short term effect of steroids on catecholamin secretion from bovine adrenal medulla chromaffin cells
Neuropharmacology, Vol. **36 (11/12)**, 173 - 178
- DeCoursey, T.E., Cherny, V.V.**, 1996: Voltage gated proton currents in human THP-1 monocytes
J. Membrane Biol. **152**, 131 - 140
- DeCoursey, T.E., Kim, S.Y., Silver, M.R., Quandt, F.N.**, 1996: Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages,
J. Membrane Biol. **152**, 141 - 157
- Denninger, J.W., Marletta, M.A.**, 1999: Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway
BBA-Bioenergetics, Vol. **1411 (2-3)**, 334 - 350
- Drenth, H.J., Seinen, W., van den Berg, M.**, 1996: Effects of TCDD and PCB 126 on aromatase (Cyp 19) activity in human choriocarcinoma cell-line (JEG-3)
Dioxin 1996, Organhalogen Compounds (**29**), ISBN 3-928379-51-8
- Drenth, H.J., Seinen, W., van den Berg, M.**, 1998: Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (Cyp 19) activity in human choriocarcinoma cell-line (JEG-3)
Toxicol. Appl. Pharm. 148 (1),
- Dvorak, Ann M.**, 1998: A role for vesicles in human basophil secretion
Cell tissue research, **293**, 1 - 22
- Eder, C.**, 1998 (I): Ion channels in microglia (brain macrophages)
Am. Physiol. Soc., **6143**, 327 - 342
- Eder, C., Fischer, H.G., Hadding, U., Heinemann, U.**, 1995 (II): Properties of voltage gated currents of microglia developed using macrophage colony- stimulating factor,
Pflügers Arch. - European J. Physiol. **430**, 526 - 533
- Eder, C., Fischer, H.- G. (III)**, 1997: Effects of colony-stimulating factors on voltage gated K⁺-Currents of bone marrow derived macrophages,
Naunyn-Schmiedebergs-Arch-Pharmacol., **355 (2)**, 198-202
- Edsall, J.T., Gutfreund, H.**, 1983: Ligand binding equilibria, Biothermodynamics, **Kapitel 5**, John Wiley & Sons Verlag, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore
- Ernährungskommission der deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde**, der Kinderarzt,
1990: Stellungnahme zu Dioxin in der Muttermilch **21 (11)**, 1633

-
- Essayan, D.M.**, 1999: Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation,
Biochem. Pharm., Vol. **57**, 965 – 973
- Fabry, Z. et al.**, 1994: Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS,
Immunology today, Vol. **15 (5)**, 218 – 224
- Fischer, H. G., Eder, C., Hadding, U., Heinemann, U.**, 1995: Cytokine-dependent K⁺ channel profile of microglia at immunologically defined functional states,
Neuroscience, **64 (1)**, 183 - 191
- Frame, G.M., Cochran, J.W., Bowadt, S.S.**, 1996: Complete PCB congener distributions for 17 Aroclor mixtures determined by 3 HRGC systems optimized for comprehensive, quantitative, congener-specific analysis,
J. High Resol. Chromatogr., Vol. **19**, 657-668
- Gantner, F. (I), Kupferschmidt, R., Schudt, C., Wendel, A.**, 1997: In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumor necrosis factor- α release by PDE inhibitors,
British Journal of Pharmacology, **121**, 221-231
- Gantner, F. (II), Schudt, C., Wendel, A., Hatzelmann, A.**, 1999: Characterisation of the Phosphodiesterase (PDE) pattern of in vitro-generated human dendritic cells (DC) and the influence of PDE inhibitors on DC function,
Pulmonary Pharmacology and Therapeutics (**12**), 377- 386
- Gantner, F.(III), Tenor, H., Gekeler, V., Schudt, C., Wendel, A., Hatzelmann, A.**, 1997:
Phosphodiesterase profiles of highly purified human peripheral blood leukocyte populations from normal and atopic individuals: a comparative study,
J. Allergy Clin. Immunol., Vol. **100 (4)**, 527- 535
- Gargett, C.E., Cornish, J.E., Wiley, G.**, 1997: Benzoyl-ATP, a partial agonist for human P2Z-receptors
Br. J. Pharmacology, Vol. **122 (5)**, 911 - 917
- Gebicke-Haerter, P.J. , Calkner, D. v. , Nörenberg, W., Illes, P.**, 1996: Molecular mechanisms of microglial activation A. implications for regeneration and neurodegenerative diseases
Neurochem. int. Vol. **29** No **1**, 1-12,
- Geneser, F. /Schwertfeger, W.**, 1990: Histologie
Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln Kapitel 8, 161-167, Kapitel 10, 177 - 203
- Gomez-Cambronero, J., Keire, P.**, 1998: Phospholipase D, a new player in Signaltransduction
Cell. Signal. **10**, 387 – 397

-
- Grassi, C., D'Ascenzo, M., Valente, A., Azzena, G.B.**, 1999: Calcium channel inhibition induced by nitric oxide in rat insulinoma RINm5F cells
Pflügers Arch- Eur J Physiol. **437**, 241-247
- Gu, B., Bendall, L.J., Wiley, J.S.**, 1998: Adenosintriphosphate induced shedding of CD 23 and L-selectin (CD 62L) from Lymphocytes is mediated by the same receptor but different metalloproteases
Blood, **92 (3)**, 946 - 951
- Hany, J., Lilienthal, H., Roth-Härer, A., Ostendorp, G. Heinzow, B. Winneke, G.O.**, 1999: Behavioral effects following single and combined maternal exposure to PCB 77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl) and PCB 47 (2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl) in rats
Neurotox. and Teratol., Vol. **21, 2**, 147-156
- Hao, C., Richardson, A., Fedoroff, S.**, 1992: Isolation of microglia from mouse astroglia cultures in:
Fedoroff, S. et al. Edu,
Protocols for neural cell culture, 97- 104, Kapitel 7
- Hara, N. et al.**, 1991: The activation of Ca²⁺-dependent K⁺- conductance by adrenalin in mouse peritoneal macrophages,
Pflügers Arch. **419**, 371- 379
- Hara, N., Ichinose, M., Sawada, M., Maeno, T.**, 1990: Extrazellular ATP activates Ca²⁺-dependent K⁺-Conductance via Ca²⁺-influx in mouse macrophages,
Comp.-Biochem.-Physiol-Act, **97 (3)**, 417-421
- Hayes, T.S., Bellington, C.J., Robinson, K.A., Sampt, E.R., Fernandez, G.A., Gomez-Cambronero, J.**, 1999: Binding of GM-CSF to adherent neutrophils activates Phospholipase D
Cell. Signal., **11 (3)**, 195-204
- Hedenskog, M., et al.**, 1997: Induction of germ-length mutations at the minsatellites PC-1 and PC-2 in male mice exposed to polychlorinated biphenyls and diesel exhaust emissions
Environ.-mol-mutagen, **30 (3)**, 254 - 259
- Holda, J. R. et al.**, 1998: Capacitive calcium entry,
News physiol. Sci., Vol. **13**, 157- 163
- Holevinsky, KO., Jow, F., Nelson, DJ.**, 1994: Elevation in intracellular calcium activates both chloride and Proton-currents in human macrophages
J.Membr. Biol. May **140 (1)**, 13-30
- Holm, P., Kankaanranta, H., Oja, S.S., Knowles, R.G., Moilanen, E.**, 1999: No detectable NO synthesis from L-arginine or NG-hydroxy-L-arginine in fMLP-stimulated human blood neutrophils despite production of nitrite, nitrate and citrullin from N^G-hydroxy-L-arginine,
J. Leuc. Biol., Vol. **66**, 127-134

-
- Humphreys, B.D., Dubyak, G.R. (I)**, 1998: Modulation of P2X₇-nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes,
J. Leukoc. Biol., **64 (2)**, 265 - 273
- Humphreys-BD, Dubyak-GR (II)**, 1998: P2X₇-receptor-activation triggers expression and release of proinflammatory cytokine IL-1 beta in monocytes and macrophages.
J.Leukoc-Biol., **64 (2)**,265-273
- Illes, P.,Norenberg, W., Gebicke-Haerter, P.J.**, 1996: Molecular mechanisms of microglial activation B. voltage- and purinoreceptor-operated channels in microglia
Neurochem. Int. Vol. **29 (1)**, 13-24
- Inglefield, J.R. and Shafer, T.(I)**, 2000: Perturbation by the PCB mixture Aroclor 1254 of GABA_A receptor mediated Calcium and Chloride responses during maturation in vitro of rat neocortical cells,
Toxicology and Applied Pharmacology **164**, 184-195
- Inglefield, J.R. and Shafer, T.J.(II)**, 2000: Polychlorinated Biphenyl-stimulation of Calcium oscillations in developing neocortical cells: A role for excitatory transmitters and L-Type Voltage sensitive Calcium channels
J. Toxicol. Exp. Therap. **295 (1)**, 105-113
- Janeway, C.A., Travers, P.**, 1997: Immunology, 2. Auflage, Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford,
Teil V: Die Bedeutung des Immunsystems für Gesundheit und Krankheit
- Jungi, T.W., Valentin-Weigand, P., Brcic, M.**, 1999: Differential induction of NO synthesis by gram-positive and gram-negative bacteria and their components in bovine monocyte derived macrophages
Microbial pathogenesis (**27**), 3 – 53
- Kandell, E.R., Schwartz, J.H.**, 1985: Principles of neural sciences, 2nd edition, Elsevier sciences, New York, Amsterdam, Oxford, Chapt. 2, Chapt. 5, Chapt. 13, Chapt. 14
- Karlson, P.**, 1984: kurzes Lehrbuch der Biochemie, 12. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Kap. 18: Hormone, Kap. 14: Phospholipide
- Kettenmann, H., Hoppe, D., Gottmann, K., Banati, R., Kreuzberg, G.**, 1990: Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages
J. Neurosci. Res.,Vol. **26**, 278 - 287
- Khakh, B.S., Bao, X., Labarca, C., Lester, H.A.**, 1999: Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion-selectivity in seconds.
Nature Neuroscience, Vol. **2 (4)**

-
- Kim, S. Y., Silver, M.R., DeCoursey, T.E.**, 1996: I. Ion channels in human THP-1 monocytes
J. Membrane Biol. **152**, 117 - 130
- King, B. F., Townsend-Nicolson, A., Burnstock, G.**, 1998:
Metabotropic receptors for ATP and UTP: exploring the correspondence between native
and recombinant nucleotide receptors
Trends In Pharmacological Science (TIPS), Vol. **19**, 506 - 514
- Kleihauer, E. (Hrsgb.)**, 1978: Hämatologie, 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New
York, Kap. V, IX
- Koopman-Esseboom, C. et al.**, 1997: Newborn infants diagnosed as neurologically abnormal
with relation to PCB and dioxin exposure and their thyroid-hormone-status,
Dev.-med-child-neurol. **39 (11)**, 785
- Koss, G.**, 1997: in: Marquardt, H., Schäfer, S.G.: Lehrbuch der Toxikologie, Spektrum
akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, polychlorierte Biphenyle, 417-434
- Kremer, J.(I), Gleichmann, E., Esser, C.**, 1994: Thymic stroma exposed to arylhydro-carbon
receptor binding xenobiotics fails to support proliferation of early thymocytes but induces
differentiation
J. Immunol., 2778 - 2786
- Kremer, J. (II), Lai Z.W., Esser, C.**, 1995: Evidence for the promotion of positive selection of
thymocytes by Ah receptor agonist 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin
European J. Pharm., **293**, 413 - 427
- Kusner, D.J., Adams, J.**, 2000: ATP-induced killing of virulent mycobacterium tuberculosis within
human macrophages requires phospholipase D.
J. Immunol., **164 (1)**, 379 - 388
- Lara, B. (I)**, 1997: Q-type Ca^{2+} channels are located closer to secretory sites than L-type
channels: functional evidence in chromaffinal cells,
Pflügers Arch- Eur J physiol, **435**, 472- 478
- Lara, B.(II) Gandia, L., Torres, A., Olivares, R., Martinez-Sierra, R., Garcia, A.G., López, M.**, 1997:
Wide-spectrum Ca^{2+} -antagonists: lipophilicity, inhibition and recovery of secretion in chromaffie
cells
European Journal of Pharmacology **325**, 109-119
- Lara, B. (III), Gandía, L., Martínez-Sierra, R., Torres, A., García, A.G.**, 1997: A caffeine- sensitive
 Ca^{2+} store modulates K^{+} - evoked secretion in chromaffinal cells
Am. Physiol. soc. **363**, S. C 1213- 1221

-
- Lara, B. (IV) et al.**, 1997: Wide spectrum Ca²⁺ channel antagonists: lipophilicity, inhibition and recovery of secretion in chromaffinal cells,
Pflügers Arch. European J. of Pharm. **325**, 109 - 119
- Lee, S.C., Pappone, P.A.**, 1999: ATP can stimulate exocytosis in rat brown adipocytes without apparent increases in cytosolic Ca²⁺ or G-protein activation,
Biophysical Journal, Vol. **76**, 2297 - 2306
- Lewis, C.E. (I), McGee, J.O'D. (Ed.)**, 1997: Store depletion and calcium influx,
Physiological Rev., Vol. **77 (4)**, 901 - 930
- Lewis, C.E.(II), McGee, J.O'D. (Ed.)**, 1992: The Macrophage, Kapitel 1 und 2, IRL Press at Oxford University press, Oxford, New York, Tokyo, Seiten 3 bis 105
- Lovstad RZ, Halvorsen-P, Steen-PA, Lindal-S**, 1995: malignant hyperthermia-still a current and dangerous problem,
Tidsskr-Nor-Jaegeforen, **115 (12)**, 1494-1498
- Lüllmann, H., Mohr, K.**, 1999: Calcium-Antagonisten, in: Pharmakologie und Toxikologie, 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, Kap. 4, Abschnitt 2.2
- MacMicking, J., Xie, Q.-W., Nathan, C.**, 1997: Nitric oxide and macrophage function,
Annu. Rev. Immunol., **15**, 323-350
- McFarland, V.A., Clarke, J.U.**, 1989: Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis,
Env. Health perspectives, Vol. **81**, 225 - 239
- McKinnley, LC., Gallin, EK**, 1990: Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J 774.1 cells
J. Membr. Biol. **116 (1)**, 47 – 56
- Messeri, M.D.**, 1997: Die Neurotoxizität von polychlorierten Biphenylen: Vergleich der Wirkung coplanarer und nicht-coplanarer Kongenere in vitro,
Inaugural Dissertation, Uni Düsseldorf
- Messeri, M.D., Bickmeyer, U., Weinsberg, F., Wiegand, H., II**, 1997: Congener specific effects by polychlorinated biphenyls on catecholamine content and release in chromaffine cells,
Arch. Toxicol. (**71**), 416-421
- Metcalfe, D., Baram, D. and Mekori, Y. A.**, 1997: Mast cells,
Physiological reviews, **77 (4)**, 1033- 1079
- Miller, Richard J.**, 1998: Presynaptic receptors,
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **38**, 201 - 227

-
- Mitteilung XIII der Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln**, 1988:
DFG (Hersgb.), Polychlorierte Biphenyle: Bestandsaufnahme über Analytik, Vorkommen,
Kinetik und Toxikologie, 1-146, VCH-Verlag
- Mohaupt, M. G., Fischer, T., Schwöbel, J., Sterzel, R.B., Schulze-Lohoff, E.**, 1998:
Activation of purinergic receptors inhibits inducible NO synthase in cultured rat mesangial
cells
Am. J. Physiol. (275), (Renal Physiol. 44) F 103- F110
- Motulsky, H.J.**, 1999: Analyzing Data with GraphPad Prism, GraphPad Software Inc.,
San Diego CA
- Mundy, W., Shafer, T.J., Tilson, H.A., Kodavanti, P.R.S.**, 1999: Extracellular calcium is required
for the polychlorinated biphenyl-induced increase of intracellular free calcium levels in
cerebellar granule cell culture
Toxicology **136**, 27 – 39
- Nabokina, S. et al.**, 1997: Intracellular location of SNAP-25 in human neutrophils, Biochem. and
Biophys. Res. Commun. **239**, 592 - 597
- Naccache, P. et al.**, 1998: Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor modulates the
excitation-response coupling sequence in human neutrophils,
J. of Immunology, Vol. **140**, 3541 - 3546
- Nakatsubo, N., Kojima, H., Kikuchi, K., Nagoshi, H., Hirata, Y., Maeda, D., Imai, Y. Irimura, T.,
Nagano, T.**, 1998: Direkt evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial
cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins,
Febs letters **427**, 263-266
- Naumov (I), Kaznacheyeva, Kiseliov et al.**, 1995: ATP-activated inward current and Calcium-
permeable channels in rat macrophage plasma membranes,
J.Physiol. Lond. **486 (Pt2)**, 323-337
- Naumov (II), Kaznacheyeva, Kuryshev et al.**, 1995: Selectivity of ATP-activated GTP-dependent
Ca²⁺-permeable channels in rat macrophage plasma membrane,
J.Membr. Biol. **148 (1)**, 91-98
- Neher, E.**, 1998: Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in
neurotransmitter release,
Neuron, Vol. **20**, 389- 399
- Newton, C.R., Graham, A.**, 1994: PCR, Spektrum akademischer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York

-
- Norén, K., Lundén Å , Petterson, E., Bergman, Å.,** 1996: Methylsulfonyl Metabolites of PCBs and DDE in human milk in Sweden, 1972-1992
Environ health perspect, **104**, 766-772
- Numberger, M., Draguhn, A,** 1996: Die patch-clamp Methode,
Spektrum akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Nüße, O. et al.,** 1997: Store-operated Ca²⁺ influx and stimulation of exocytosis in HL-60 granulocytes,
J. Biol. Chem., Vol. **272 (45)**, 28360 - 28367
- Nuttle, L.C. and Dubyak, G.R., J.,** 1994: Differential activation of cation channels and non-selective pores by macrophage P2Z purinergic receptors expressed in Xenopus oocytes
Biol. Chem.Vol. **269 (19)**, 13988- 13996
- Olbrück, H., Seemayer, N.H., Voss, B., Wilhelm,** 1998: Supernatants from quartz dust treated human macrophages stimulate cell proliferation of different human lung cells as well as collagen-synthesis of human diploid lung fibroblasts in vitro,
Toxicology letters (**96/97**), 85-95
- Osborne, M.,** 1998: in: Cell biology 2nd edition, Vol. **2**, 462-468, Celis, J. (Herausgeber), academic press, San Diego,
London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- Oshimi, Y., Miyazaki, S., Oda, S.,** 1999: ATP-induced Ca²⁺ response by P_{2U} and P_{2Y} purinoreceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages,
Immunology, **98**, 220-227
- Parekh, A. B. (I), Fleig, A., Penner, R.,** 1997: The store operated calcium current I_{CRAC}: nonlinear activation by InsP₃ and dissoziation from calcium release,
Cell, Vol. **89**, 973 - 980
- Parekh, A. B.(II),** 1998: Voltage- dependent conductance changes in a nonvoltage-activated sodium current from a mast cell line,
J. Membrane Biol. **165**, 145 - 151
- Partridge, L.D., Swandulla, D.,** 1990: Non-specific-cation channels (Chapt. 7) in: Potassium-Channels, structure, function, classification, and therapeutical potency,
Cook, N. S. (ed.), Ellis Hoorwood-Verlag
- Perry, V. H. and Gordon, S.,** 1998: Macrophages and microglia in the nervous system,
TINS, **11(6)**, 273-277
- Persechini, PM et al.,** 1998: Extracellular ATP in the lymphohematopoietic system: P2Z purinoreceptors off membrane permeabilisation,
Braz. J. Med. Biol. Res., **31 (1)**, 25 – 34

-
- Raff, Martin**, 1998: Cell suicide for beginners,
Nature **396**, 119- 129
- Raivich, G., Ohatschek, M., Kloss, C.U.A., Werner, A., Jones, L.L., Kreutzberg, G.W.**, 1999:
Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms
and cues to physiological function,
Brain res. reviews, Vol. **30**, 77 - 105
- Ralevic, V. and Burnstock, G.**, 1998: Receptors for Purines and Pyrimidines,
Pharmacological reviews, Vol. **50 (3)**, 415-492
- Rassendren, F., Buell, G.N., Virginio, C., Collo, G., North, R.A., Surprenant, A.**, 1997: The
permeabilizing ATP receptor P2X₇,
J. Biol. Chem., **(272)**, 5482-5486
- Ranriamampita, C. and Tsien, R.**, 1993: Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel
small messenger that stimulates Ca²⁺ influx,
Nature, Vol. **364**, 809- 814
- Rosenthal, W., Hescheler, J., Trautwein, W., Schultz, G.**, 1988: Receptor- and G-Protein-
mediated Modulations of Voltage-dependent Calcium channels,
Cold Spring Harbour Symposia on quantitative Biology, Vol. **LIII**, 247- 254
- Rossier, M.**, 1997: Confinement of intracellular calcium signalling in secretory and steroidogenic cells,
Europ. J. Endocrinol., **137**, 317 - 325
- Safe, S.H.(I)**, 1984: Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs):
biochemistry, toxicology, and mechanism of action
Critical reviews in toxicology , Vol. **13 (4)**, 319 - 395
- Safe, S.H.(II)**, 1994: Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and
toxic response, and implications for risk assessment
Critical reviews in Toxicology, **24 (2)**, 87 - 149
- Saier, M.H. jr. et al.**, 1999: Phylogenetic characterisation of novel transport protein families
revealed by genome analyses
Biochim. Biophys. Act. **1422**, 1 - 56
- Sakman, Bert und Neher, Erwin, (Herausgeber)**, 1995: single channel recording, Kapitel 1, 2, 4,
17,18 plenum press, New York, London
- Schins, R.P.F., und Borm, P.J.A.**, 1995: Epidemiological evaluation of release of monocyte TNF- α
as an exposure and effect marker in pneumoconiosis: a five year follow up study of coal
workers,
Occu. Environ. Med. **52**, 441- 450

-
- Schmidt Mayer, J., Jacobsen, C., Miksch, G., Sievers, J.,** 1994: Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into mikroglia-like cells on monolayers of astrocytes: membrane-currents,
GLIA; **12(4)**, 259-267
- Schnabel, R. Palmer, M., Kilpatrick, I.C., Collingridge, G.L.,** 1999: A CaMKII inhibitor, KN-62, facilitates DHPG-induced LTD in the CA1 region of the hippocampus,
Neuropharmacology **38**, 605-608
- Schrentzel, J., Serrander, L., Bánfi, B., Nüße, O., Fouyouzi, R., Lew, D.P., Demaurex, N., Krause, K.H.,** Electron currents generated by the human phagozyte NADPH oxidase,
Letters to Nature, Nature, Vol. **392**, 734 – 737
- Schümann, J., Tiegs, G.,** 1999: Pathophysiological mechanisms of TNF- α during intoxication with natural or man made toxins,
Toxicology **138**, 103 - 126
- Schwartz, L.M., Osborne, B.A.,** 1993: Programmed cell death, apoptosis and killer genes,
Immunology today, Vol. **14 (12)**, 582 - 590
- Seemayer, N.H., Braumann, A., Maly, E.,** 1987: Development of an in vitro testsystem with human macrophages and fibroblasts for analysis of the effect of quarz dusts and coal mine dusts. I. Formation of a fibroblast proliferation factor)
Silicosis Rep. North-Rhine-Westfalia **16**, 143-155
- Sequeira, S.M. et al.,** 1999: Both protein kinase G dependent and independent mechanisms are involved in the modulation of glutamate release by nitric oxide in rat hippocampal nerve terminals
Neuroscience letters **261**, 29 - 32
- Silinsky, E.,** 1985: The biophysical pharmacology of calcium-dependent acetylcholin-secretion,
Pharmacological reviews, Vol. **37(1)**, 81 - 132
- Spanswick, D., Smith, M.A. et al.,** 1997: Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels,
Nature Vol. **390 (4)**, 521 - 525
- Stuehr, D.J. et al,** 1991: Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs
FASEB J., **5 (1)**, 98 - 103
- Sutko, J.L. et al.,** 1997: The pharmacology of ryanodine and related compounds,
Pharmacological reviews, Vol. **49**, 53 – 98

-
- Taanman, J. W.**, 1999: The mitochondrial genome: structure, transscription, translation and replication
Biochim. Biophys. Act. **1410**, 103 - 123
- Thomas, A.P., Delaville, F.**, 1991: The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic free calcium concentrations in cell populations and single cells in:
McCormack, J.G., Cobbold, P.H. (eds):
Cellular Calcium: a practical approach, Oxford university press, chapt. 6, 1-54
- Tian, Y., Ke, S., Denison, M.S., Rabson, A.b., Gallo, M.A.**, 1999: Ah receptor and NF-k-B Interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity
J. Biol. Chem., **274 (1)**, 510-515
- Tilson, HA., Kodavanti, PR.**, 1997: Neurochemical effects of polychlorinated biphenyls: an overview and identification of research needs.
Neurotoxicology, **18 (3)**, 727 - 743
- Townsend-Nicholson, A., King, B.F., Wildman, S.S., Burnstock, G.**, 1999: Molecular cloning, functional characterisation and possible cooperativity between the murine P2X₄ and P2X_{4a} receptors
Molecular brain research **(64)**, 246 - 254
- Toxicological profile for polychlorinated biphenyls**, 1997: draft for public comment, U.S. Department of health and human services, public health service, Kap. 2
- Twitchell, W.A. et al.**, 1997: Ca²⁺- dependent K⁺ Channels in bovine adrenal chromaffin cells are modulated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid
J. membrane Biol. **158**, 69- 75
- U.S. department of health human services**, 1999: draft for public comment, chapter 2, 15 -272, toxicological profile for polychlorinated biphenyls (update)
- Umweltbundesamt I, Institut für Wasser-, Boden-, und Lufthygiene, Kommission "Human-Biomonitoring"**, 1999: Stoffmonographie PCB- Referenzwerte für Blut, Berlin, Bundesgesundheitsblatt **42**, 511-521
- Umweltbundesamt II, Institut für Wasser-, Boden-, und Lufthygiene, Kommission "Human-Biomonitoring"**, 1999: Berlin, Referenzwerte für HCB-, β-HCH, DDT und PCB in Frauenmilch
Bundesgesundheitsblatt **42**, 533-539
- von Albertini, M. et al.**, 1998: Extrazellular ATP and ADP activate transscriptionfactor NF-kappa-B and induce endothelial cell apoptosis
Biochem. Biophys. Res. Commun., **248 (3)**, 822 - 829

-
- Venkatesvara, J.R., Desaiyah, D., Vig, P.J.S., Venkatesvarlu, Y.,** 1998: Marine biomolecules inhibit rat brain nitric oxide synthase activity
Toxicology, **129**, 103-112
- Ville, P. et al.,** 1995: PCBs increase molecular-related activities (Lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms,
J. invert. Pathol. (**65**), 217 - 224
- Voie, .A., Fonnum, F.,** 1998: Ortho substituted polychlorinated biphenyls elevate intracellular Calcium in human granulocytes
Environmental Tox. Pharm., 105 - 112
- Watson, J.D., et al.,** 1995: Principles of Cell and molecular biology, 2nd edition, Harper Collins College Publishers, Chapt. 16, pp. 715 - 739, Chapt. 7, pp. 291 - 308
- Weinsberg, F., Bickmeyer, U., Wiegand, H.,** 1994: Effects of tetandrin on calcium channel currents of bovin chromaffin cells
Neuropharmacology, Vol. **33 (7)**, 885 - 890
- Weistrand, C., Norén, K.,** 1997: Methylsulfonyl Metabolites of PCBs and DDE in human tissues,
Environ health perspect 105, 644-649
- Wellhöner, H.H.,** 1988: Pharmakologie der Nervenleitfähigkeit, Pharmakologie cholinerner Synapsen,
Pharmakologie und Toxikologie, 4. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Wilson, R.I.(I) et al.,** 1997: Endothelial nitric oxide synthase and LTP
Nature, Vol. **386**, 338
- Wilson, R.I.(II) et al.,** 1999: Mice deficient in endothelial nitric oxide synthase exhibit a selective deficit in hippocampal long-term potentiation
Neuroscience, Vol. **90 (4)**, 1157 - 1165
- Winneke, G.O.,** 1995: Endpoints of developmental neurotoxicity in environmentally exposed children
Toxicol. Letters. **77**, 127-136
- Zwilling, B.S., Eisenstein, TK (Ed.),** 1994: Macrophage-Pathogen interactions
Dekker, Inc., N.Y., Basel, Hongkong

8. Index der Abbildungen, Tabellen und Fotos:

Abbildungen:

- Abbildung 1: Nomenklatur der Polychlorierten Biphenyle nach Position der Substituenten.
Abbildung 2: räumliche Anordnung der PCB-Kongenerere nach Position und Zahl der Chlor-substituenten
Abbildung 3: vorgeschlagene Stoffwechselwege der polychlorierten Biphenyle im Säuger-organismus
Abbildung 4: Der Makrophage im Cytokin-Netzwerk
Abbildung 5: schematische Darstellung der Calciumregulation beim Makrophagen
Abbildung 6: Übersicht über die Klassen der Purinrezeptoren und deren spezifische Agonisten
Abbildung 7: Patch-Clamp-Konfigurationen
Abbildung 8: Parameter zur Ermittlung der Ratio-Kalibrierung aus einem Ansatz bei Humanmakrophagen
Abbildung 9: Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht Sortierung von Humanmakrophagen zur Selektion im Fluoreszenz aktivierten-Zell-Sorting
Abbildung 10: Reaktionsschema zum Nachweis von Gesamtnitrit durch die Griess-Reagentien 1 und 2 (Griess Reaktion)
Abbildung 11: Durchführung und Testprinzip des EIAs für zyklische Nukleotide, hier cAMP
Abbildung 1.1: Charakterisierung der Makrophagen in Kultur in Abhängigkeit vom Kulturzeitraum
Abbildung 1.2: immunologischer Nachweis von CD11c (α -Integrin)- positiven Zellen mittels α CD11c-Biotin- Strept-avidin-Cytochrom, Lebendfärbung
Abbildung 1.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Makrophagen
Abbildung 12: Mitochondrialer Tetrazolium-Test bei Humanmakrophagen
Abbildung 13a: ATP-induzierte zytosolische Calciumspiegeländerungen humaner Makrophagen in der Calcium-Fluoreszenzspektrophotometrie
Abbildung 13b: reduzierte Sekundärantwort durch zweifache ATP-Gabe innerhalb von 10 Minuten
Abbildung 14: ATP [100 μ M] Erst- und Zweitantwort vor und nach 40 Minuten PCB 47 [100 μ M].
Abbildung 15: Vergleich der ATP-Erstantwort ohne und Zweitantwort nach 40 Minuten unterschiedlichen PCB 47 Konzentrationen in der Calciumspektrofluorimetrie im paired t-test
Abbildung 16a: Konzentrations-Effektbeziehungen für Kontrollen und 5h PCB 47 ('2,4,T') [100 μ M] vorbehandelte Zellen
Abbildung 16b: scatchard-plot für ATP-Kontrolle und PCB-47
Abbildung 16c: Originalaufnahmen von mit fünf Mikromolar ATP (etwa EC₅₀-Wert)-stimulierten Makrophagen nach fünf Stunden PCB 47-Vorbehandlung mit unerschiedlichen PCB-Konzentrationen
Abbildung 17: Konzentrations-Effektkurven für Kontrolle und 5h [100 μ M] PCB77 (3,3',4,4'), einem nicht orthochlorierten, planaren PCB-Kongener
Abbildung 18: Inhibition der ATP-induzierten Sekundärantwort durch XAMR
Abbildung 19a: XAMR-abhängige ATP-Konzentrations-Effekt-Beziehung
Abbildung 19b: Konzentrations-Effekt-Beziehungen für Kontrolle, 5h PCB 47 [100 μ M] und 10 Minuten XAMR [1 μ M]/ 5h PCB 47 [100 μ M] vorbehandelte Zellen
Abbildung 20: Inhibitions-Konzentrationskurve für den ATP-Rezeptorantagonisten Suramin
Abbildung 21a: N-Acetyl-D-Arginin-Abhängigkeit (NAA) des ATP-induzierten Calciumeinstroms in Makrophagen
Abbildung 21b: Konzentrations-Effekt-Beziehungen für 1.5h N-Acetyl-D-Arginin [10 μ M, 'NAA'], 5h PCB 47 [100 μ M, '2,4 TCB'] oder 5h PCB 47/1.5 h NAA ['NAA/2,4T']-vorbehandelte Zellen
Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis der iNOS-Expression
Abbildung 23: Quantitative Auswertung für jeweils 85 Zellen für die immunhistochemische Bestimmung der iNOS-Expression.
Abbildung 24: Inhibition der PCB 47 [100 μ M], 5h und N-Acetyl-D-Arginin [10 μ M], 1.5h verstärkten Calciumströme über Purinrezeptoren bei Makrophagen durch 15 Minuten [250 μ M] NO-Donor S- Nitroso-D,L-Penicillamin'

-
- Abbildung 25: Gesamtnitritfreisetzung in 16 Stunden [10µg/ml] LPS induzierten und 5h in HBS/ Medium oder 5h mit unterschiedlichen PCB 47-Konzentrationen vorbehandelten Makrophagen
- Abbildung 26a: Durch verschiedene Agonisten hervorgerufene Calciumspiegeländerungen bei Humanmakrophagen
- Abbildung 26b: Vergleich der maximalen zytosolischen Calciumerhöhungen bei verschiedenen Agonisten für ATP-Rezeptoren in Kontrollen und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Zellen.
- Abbildung 27: maximale Antworten nach den verschiedenen Agonisten für Kontrolle, 5h PCB 47 [100µM], und den Calcium-Calmodulinkinase- und P2X₇-Rezeptor-Antagonisten KN-62 in Verbindung mit PCB 47
- Abbildung 28: Durch verschiedene Agonisten induzierte Calciumleveländerungen in Kontrollen und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Zellen, nach [20µM] 8-bromo-cAMP und nach 5h PCB 47 [100µM]/15Minuten 8-bromo-cAMP [20µM]
- Abbildung 29: Durch verschiedene Agonisten induzierte Calciumleveländerungen in Kontrollen und 5h PCB 47 [100µM] vorbehandelten Zellen nach 15 Minuten [125µM] 8-bromo-cGMP
- Abbildung 30: Konzentrations-Effektbeziehung für 2'-3'-(4-benzoyl-)benzoyl-ATP im Vergleich zur ATP-Kontrolle
- Abbildung 31: Inhibition der benzoyl-benzoyl-ATP induzierten Calciumspiegeländerungen nach PCB-Vorinkubation durch Inhibitoren der Phospholipasen C und D
- Abbildung 32: Konzentrations-Effektbeziehungen für Kontrolle mit Calcium (ATP-Kontrolle + Ca²⁺) und Calciumentzug (ATP-Kontrolle - Ca²⁺) und nach 5h PCB 47 [100µM] unter Calciumentzug extrazellulär
- Abbildung 33: Konzentrations-Effektbeziehungen für ATP-Kontrollen nach Calciumentzug, erstellt am Tag 8/9 in Kultur und Tag 12/13 in Kultur
- Abbildung 34: cAMP-Spiegel bei PCB 47 vorbehandelten Humanmakrophagen
- Abbildung 35: zytosolischer cAMP-Spiegel nach 5h PCB 47 im Vergleich zu 5h 25µM Forskolin/ PCB 47
- Abbildung 36: cAMP-Verringerung durch Stickstoffoxydsynthasenhinhibition
- Abbildung 37: TNFα-Freisetzungsexperiment nach Kontrolle, 30 Minuten LPS [10µg/ml], 5h 100µM PCB und 100 Sekunden ATP- bzw. benzoyl-benzoyl-ATP
- Abbildung 38a: N^G-Amino-L-Arginin und PCB 47 induzierte Verringerung des zytosolischen Spiegels an zyklischem Guanosinmonophosphat, cGMP
- Abbildung 38b: zytosolische cGMP-Verringerung durch PCB 47/N^G-Amino-L-Arginin
- Abbildung 39: Calcium-Spektrofluorimetrie chromaffiner Zellen nach [100µM] PCB 47-Behandlung mit und ohne Calciumentzug
- Abbildung 40: Maximale Amplitude der PCB-verursachten Calciumerhöhungen
- Abbildung 41a: Strom-Spannungskurven boviner chromaffiner Zellen im 'whole-cell'-Modus
- Abbildung 41b: Whole-cell-Gesamtmembranströme boviner chromaffiner Zellen für Kontrolle und 5h PCB 47 [100µM] Vorinkubation
- Abbildung 41c: Maximale Amplituden der Strom-Spannungskurven in 2a und 2b
- Abbildung 41d: Membranpotentiale der in 2a bis c gezeigten Ansätze
- Abbildung 41e: PCB [100µM] induzierter Bariumstrom über Calciumkanäle
- Abbildung 42a: Membranpotentiale für Kontrollen, 3h [20µM] NPA oder 5h [20µM] PCB 47 vorbehandelte bovine chromaffine Zellen
- Abbildung 42b: Spontanöffnungsrate von Einzelkanälen in Kontrollen, 3h [20µM] NPA oder 5h [100µM] PCB vorbehandelten bovinen chromaffinen Zellen
- Abbildung 42c: Spontanfrequenzen versus Offendauer von Einzelkanalöffnungen
- Abbildung 43: simplifizierte schematische Vorstellung der PCB 47-Wirkung bei Humanmakrophagen
- Abbildung 44: (Anhang) Strukturvergleich zwischen Nifedipin und PCB 47

Tabellen:

- Tabelle 1: Ionenkanäle bei Humanmakrophagen und verwandten Zelllinien
Tabelle 2: Bestimmung des Anteils der in der Kultur identifizierten Makrophagen
Tabelle 3: Quantifizierung der UTP/UDP-Antworten im Calcium-Imaging nach wiederholter Agonisten-Applikation innerhalb von jeweils 8 Minuten.
Tabelle 4: Variablen aller erstellten Konzentrations-Effekt-Beziehungen mit dem jeweils optimalen Anpassungsmodell für nichtlineare Regression mit sigmoider Anpassung
Tabelle 5: Scatchard-Analysen der verschiedenen Konzentrations-Effektbeziehungen
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse an den durch Agonisten unterscheidbaren Rezeptorklassen hinsichtlich des PCB-Einflusses.
Tabelle 7: Rezeptoren mit cAMP als zweitem Botenstoff
Tabelle 8: Referenzwerte für PCBs in Humanmatrices und tägliche Aufnahme

Fotos:

- Foto 1: (Abbildung 1.2) immunologischer Nachweis von CD 11c-positiven Zellen mittels α CD11c-Biotin-Streptavidin-Cytochrom, Lebendfärbung, Lichtmikroskop: 100X Ölimmersion, Phasenkontrast, Fluoreszenz: Cy3-LP-Filter, 630nm, Phasenkontrast, ICCD Sony Kamera, analySIS 3.0, Computerausdruck
- Foto 2: (Abbildung 1.3) rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Makrophagen, 4000, SEM Philips 515. Zellen fixiert mit 2.5% Glutaraldehyd, entwässert und HMDS (Hexamethyldisilazan, Fa. Polyscience) getrocknet. Kontastierung mit Osmiumtetroxyd
- Foto 3: (Abbildung 22) immunohistochemischer Nachweis der iNOS-Expression, Sony ICCD Kamera, 20x, Ph1, AWD Hintergrundkorrektur, Filter1 analySIS 3.0, Computerausdruck

9. Publikationsliste:

Tagungen:

- (1)** Dortmund, Dezember 1999, Eurotox-Symposium

- (2)** Mainz, März 2000, Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. Dehnhardt, M., Desai, D., Wiegand, H.: Involvement of inducible NO synthase in PCB enhanced intracellular calcium regulation through purinergic receptor activation in human macrophages. *NS Arch. Pharmacol.* 361(4), Suppl., 150, 2000.

- (3)** Leicester, Grossbritannien, Juli 1999, European Neurotoxicity Association, ENA 7-Kongress. Dehnhardt, M., Desai, D., Wiegand, H.: Polychlorinated biphenyls increase intracellular calcium through purinergic receptor activation in human macrophages. *Neurotoxicology* 21(4), 639, 2000.

- (4)** Philadelphia, USA, April 2000, American Society of Toxicology, SOT, 39. Jahrestagung. Dehnhardt, M., Desai, D., Wiegand, H.: Polychlorinated biphenyls enhance intracellular calcium through purinergic receptor activation in human macrophages. *Toxicol.Sci.* 54, 75, 2000.

- (5)** Boston, USA, Juni 2000, American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Desai, D., Dehnhardt, M., Wiegand, H.: Regulation of inducible nitric oxide synthase in human macrophages by purinergic receptor ligands. *The FASEB J.* 14, A1379, 2000.

- (6)** Ferrara, Italien, September 2000, 1st International workshop on nucleotides and their receptors in the immune system. Dehnhardt, M., Desai, D., Wiegand, H.: Positive modulation of purinergic receptors in human macrophages by iNOS inhibition.

- (7)** San Francisco, USA, März 2001, American Society of toxicology, 40. ste Jahrestagung, Wiegand, H., Desai, D., Dehnhardt, M.: purine receptor signal transduction is inhibited by polychlorinated biphenyls in human macrophages

Publikation:

Saeger, B , Schmitt-Vrede, HP , Dehnhardt, M , Benten, PM , Krücken, J , Harder, A , von Samson, G , Wiegand, H , Wunderlich, F :

Latrophilin - like receptor from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* as target for the anthelmintic decapeptide PF 1022A.

The FASEB Journal, 2001 (in press)

10. Erläuterung der verwendeten Abkürzungen und Glossar:

PCB 28	2,4,4'	Trichlorobiphenyl
PCB 47	2,4,2',4'	Tetrachlorobiphenyl
PCB 52	2,5,2',5'	Tetrachlorobiphenyl
PCB 77	3,4,3',4'	Tetrachlorobiphenyl
PCB 101	2,4,5,2',5'	Pentachlorobiphenyl
PCB 105	2,3,4,3',4'	Pentachlorobiphenyl
PCB 118	2,4,5,3',4'	Pentachlorobiphenyl
PCB 126	3,4,5,3',4'	Pentachlorobiphenyl
PCB 138	2,3,4,2',4',5'	Hexachlorobiphenyl
PCB 153	2,4,5,2',4',5'	Hexachlorobiphenyl
PCB 180	2,2',3,4,4',5,5'	Heptachlorobiphenyl

Bezeichnung für PCB-Mixturen:

Aroclor, Pyranol, Pyroclor: Vereinigte Staaten von Amerika, Großbritannien

Clorphen, Elaol: Bundesrepublik Deutschland

Kaneclor: Japan und Korea

Apriolio, Fenclor: Kennzeichnung für PCBs in Italien

Abkürzungen und Glossar:

2,2' DCB 2,2'-Dichlorbiphenyl
4,4' DCB 4,4'-Dichlorbiphenyl

ADI acceptable daily intake, d.i. Die Menge eines Stoffes, die nach Richtlinien der ADF und MAK-Kommission selbst bei lebenslanger Exposition zu keinen adversen Gesundheitseffekten führt

àP2X₇ Antikörper gegen P2X₇-Purinrezeptoren

àP2X₁ Antikörper gegen P2X₁-Purinrezeptoren

APO-B-100-R Rezeptoren auf der Oberfläche bestimmter Organe für das in Chylomikronen und Lipoproteinen der Blutes enthaltene Apoprotein B 100.

PCB-Kongenere, Gehalt > 0.5%, > 5%, >10%:

Aroclor 1016

1,4,6,**8**,9,15,16,17,**18**,19,20,22,25,26,27,**28,31,32,33**,37,42,44,45,47,48,49,52,53,64,70,71
alle höherchlorierten: 0.03- 0.33%

Aroclor 1232

1,2,3,4,6,7,**8**,9,10,15,16,17,18,22,26,27,28,31,32,33,37,40,41,42,44,45,47,48,49,52,53,
64,70,71,74
alle höherchlorierten: 0.03- 0.38%

Aroclor 1242

1,4,6,**8**,15,16,17,**18**,19,20,22,25,26,**28,31,32,33**,37,40,41,42,44,45,47,48,49,52,56,60,64,66,
70,71,74,87,95,99,101,105,110,118
alle höherchlorierten: 0.05 - 0.16

Aroclor 1248

16,17,18,22,**28,31**,32,33,37,40,41,42,**44**,45,47,48,49,**52**,53,56,60,64,**66,70**,71,74,82,
84,85,87,91,95,97,99,101,105,110,118
alle höherchlorierten 0.02 – 0.43

Aroclor 1254

44,49,52,56,60,64,66,**70**,74,82,84,85,87,91,92,95,97,99,**101,105,110,118**,128,130,132,
135,**138**,141,146,149,153,156,158,163,170,180
alle höherchlorierten PCBs: 0.01 – 0.25

Aroclor 1260

95,101,110,118,128,132,135,136,**138**,141,144,146,**149**,151,**153**,156,158,163,164,170,171,
172,174,176,177,178,179,**180**,183,185,**187**,190,193,194,195,196,199,203,206
alle höherchlorierten PCB: 0.06 – 0.16

Aroclor 1262

95,101,132,135,136,138,141,146,**149**,151,**153**,163,170,171,172,**174**,176,177,178,179,**180**,
183,185,187,190,193,194,195,196,199,200,201,202,206
alle höherchlorierten PCB:0.17 – 0.29

(Frame et al.,1996)

Der jeweilige Nummerncode der Gemisch-Bezeichnung gibt stets Auskunft über den Chlorierungsgrad, bei den Arocloren die letzten beiden Ziffern.

Die sechs Leitkongenere, PCB 28, 52, 118, 138, 153, 180 liefern Referenzen für die unterschiedlichen Gemischzusammensetzungen.

ATP	Adenosintriphosphat
B 7	Protein auf der Oberfläche von B-Zellen, das das entscheidende costimulatorische Signal bei der Makrophagen oder T-Zell-Aktivierung vermittelt
B-Zellen	Lymphozyten, deren Name aus der Entdeckung in der Vogel bursa fabricii herrührt
⁴⁵ Ca ²	Calcium-Isotop
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat, wichtiger intra- und interzellulärer Botenstoff

CD	Differenzierungscluster (Cluster of differentiation), Satz von Oberflächenproteinen, deren Spektrum charakteristisch für die Entwicklungsstufen eines Zelltyps ist
CD11c	Oberflächenantigen aus der α -Integrin-Familie, wird auf Zellen der Monozyten/Makrophagenzelllinie gefunden
CD14	Oberflächenantigen der Monozyten/ Makrophagen, dendritischen Zellen und anderer primär phagozytischer Zellen, Lipopolysaccharidrezeptor
CD 18	Oberflächenantigen von Mononukleären Phagozyten, Neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), β -Kette der heterodimeren Leukozytenantigene MAC-1 (CD 18/11b), LFA1 (CD 18/11a), p150 /95(CD18/11c, s.o.).
CD 40	Oberflächenantigen auf Makrophagen und B-Lymphozyten, übermittelt wichtiges costimulatorisches Signal bei der Aktivierung durch T-Helferzellen (über TNF-Familienproteine CD40-Ligand) oder Auslösen von Apoptose (FAS)
CD4-T-Zellen	Subpopulation der T-Lymphozyten (auch: T-Helferzellen), erkennen über MHC II-präsentierte Peptide
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat, wichtiger intrazellulärer Botenstoff
Clophen A 60	PCB-Gemisch deutschen Ursprungs mit 60% Chlorierungsgrad
Complement- R I,3,4, C1Q	Rezeptoren verschiedener Proteinkomponenten des Complementsystems (nicht zellgebundener Anteil der unspezifischen Pathogenabwehr des Immunsystems)
CRAC	Calcium-Release-Activated Channels, über Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern in der Extrazellulärmembran aktivierte Ionenkanäle, meist Kalium
CyP I A1, A2, B1, B2, III a	verschiedene Klassen der 27 Cytochrom-Familien
Cyt P 19	Cytochromanteil der Aromatase
Cyt P 450	System einer riesigen Familie von bei der Metabolisierung von Fremdstoffen und körpereigenen Stoffen beteiligten Enzymen, bestehen aus drei funktionellen Einheiten: Cytochrom, Cytochromoxidase und Co-Faktor NADPH (Nicotin-Adenin-Dinukleotidphosphat)
DNA	Desoxyribonucleinsäure, Erbinformation, in allen Körperzellen gleich, mit Ausnahme bestimmter Zellen des Immunsystems
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Chelator zweiwertiger Kationen
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat, Calciumchelator
EROD	Ethoxyresorufindecarboxylase, als Aryl-Hydrocarbonrezeptor induziertes Enzym Testsystem für polyhalogenierte Biphenyle
FAS (CD 95)	Rezeptor für Protein aus Tumornekrosefaktor-Familie (Fas-Ligand, CD 95L), überträgt Signal zur Apoptose nach intrazellulär

Fc- γ -R I, IIa, III	Rezeptoren für eine konservative Region (Fc-Teil) der von B-Lymphozyten produzierten Immunglobuline. γ - bezeichnet den Rezeptor für Immunglobuline aus der G-Familie (IgG) mit drei Subtypen
Fc-Rezeptoren	Rezeptoren für eine konservative Region (Fc-Teil) der von B-Lymphozyten produzierten Immunglobuline, A (auch als Dimer vorliegend), D, G, M (auch als Pentamer vorliegend), E. Rezeptorklassen werden entsprechend der Immunglobulinfamilie mit griechischen Buchstaben bezeichnet
FEV1	fociertes Ausatemvolumen (forced exhausting volume), wichtiger Lungenfunktionsparameter
FVC	forcierte Vitalkapazität (forced vital capacity), Lungenfunktionsparameter
GAP-junctions	eine aus sechs Untereinheiten (GAP-Proteinen) bestehende Verbindungspore zwischen zwei verschiedenen Zellen, die zum Stoffaustausch von Ionen und Molekülen bis 900Da dient und bei hohen zellulären Calciumspiegeln entkoppelt
GM-CFU	Granulozyten/Makrophagen Kolonie bildende Einheit (...colony forming unit), Vorläuferzellen der Granulozyten/Makrophagen im Knochenmark
GSH	Glutathion, Peptid bestehend aus drei verschiedenen Aminosäuren, das auch als Dimer (GSSG) im oxidierten Zustand vorliegen kann. Dient als Redoxüberträger, Schutzprotein gegen Oxidation zellulärer Komponenten durch freie Radikale und Kopplungssystem bei der Entgiftung und Ausscheidung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd, Substrat für Katalase und andere vesikuläre Verdauungsenzyme
HDL	lebersynthetisierte Lipoproteine hoher Dichte (high density lipoproteins), Stofftransport im Blut
IC ₁₀	Inhibitionskonstante 10, d.h. der Werte einer Konzentrations/Effektbeziehung, bei dem 10% der maximalen Inhibition vorliegen, Maß für die Steilheit einer Kurve
IC ₅₀	nach dem Massenwirkungsgesetz der Wert einer Konzentrations/Effektbeziehung, bei dem 50% der maximalen Inhibition vorliegen
IC ₉₀	Inhibitionskonstante 90, d.h. der Werte einer Konzentrations/Effektbeziehung, bei dem 90% der maximalen Inhibition vorliegen, zusammen mit IC ₁₀ Maß für die Steilheit einer Kurve
ICAM-1/2/3	Immunglobulin auf vorallem Endothelzellen, Lymphozyten und dendritischen Zellen (intercellular adhesion molecule), spielen neben den anderen Strukturfamilien von Adhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine und mucinähnliche vaskuläre Adressine) wichtige Rolle bei der Leukozytenwanderung, ihrer Zielortbestimmung und bei Zell-Zell-Interaktionen
IFN- γ	gamma-Interferon, proinflammatorischer Entzündungsmediator, vorallem von Makrophagen freigesetzt

Interleukine:	von Leukozyten freigesetzte interzelluläre Botenstoffe (Zytokine) bei der Auslösung und Steuerung der Immunantwort, Beispiele sind
IL-1 (MF)	Interleukin 1 (auch Epithelzellen), Fieber, T-Zell- und Makrophagenaktivierung
IL-2 (T-Zellen)	Interleukin 2 T-Zellproliferation
IL-3 (T-Zellen)	Interleukin 3 Hämatopoese
IL-4 (T _{H2})	Interleukin 4 proinflammatorisch, Differenzierungssignal (mit GM-CSF für Monozyten zu Dendritischen Zellen), Wachstumssignal für Mastzellen, B-Zell-Aktivierung
IL-5 (T-Zellen)	Interleukin 5 Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen Granulozyten
IL-7 (KnMS)	Interleukin 7 (KnMS...Knochenmarkstroma) Differenzierung von Prä-B- und Prä-T-Zellen
IL-8 (MΦ)	Interleukin 8 chemotaktisches Signal für neutrophile Granulozyten und T-Zellen
IL-9 (T-Zellen)	Interleukin 9 Mastzellsensitivierung
IL-10 (T _{H2})	Interleukin 10 antiinflammatorisch, Makrophageninhibition
IL-11	Interleukin 11 (Stromafibroblasten) synergistisch mit IL-3 und 4 bei Hämatopoese
IL-12 (MΦ)	Interleukin 12 proinflammatorisch, intrazelluläre Viren und Bakterien aktivieren Makrophagen und NK-Zellen zur Produktion (auch von B-Zellen), fördert T-Zell-Differenzierung (CD4)
IL-13 (T-Zellen)	Interleukin 13 antiinflammatorisch, Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, hemmt Produktion inflammatorischer Zytokine von Makrophagen
in vitro	in Zellkultur
in vivo	im lebenden Organismus
ionotrop	Porenproteine mit Leitfähigkeit für Ionen
IP ₃	Inositoltriphosphat, wichtiger zweiter Botenstoff nach Phospholipase C-Aktivierung, wird in der inneren Zellmembran aus Phosphatidylinositol (zusammen mit Diacylglycerol in äquimolarem Verhältnis) generiert.
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl.: international union of pure and applied chemistry), nach ihren Gesetzen weltweit Federführend in Nomenklatur und Vereinheitlichung der Nomenklatur der Elemente und Verbindungen
LDL	Lipoproteine geringer Dichte

Leberleitenzyme:

γ -GT = gamma-Glutamyltransferase

ALT = Alanin-Aminotransferase

AP = Alkalische Phosphatase

LDH = Lactatdehydrogenase

Enzyme, die ausschließlich oder überwiegend nur in der Leber exprimiert werden und deshalb in der Leberdiagnostik Verwendung finden

LFA zelluläre Adhäsionsmoleküle der Integrin- (LFA 1, T-Zellen) und Immunglobulinfamilie (LFA-2 und 3)

LOAEL lowest observed adverse effect level, die niedrigste Konzentration einer toxischen Substanz, bei der bereits adverse (d.h. schädigende) Effekte beobachtet werden

LOEL lowest observed effect level: geringste Konzentration eines Stoffes, bei dem in einem experimentellen System Veränderungen bzw. Effekte beobachtet werden

L-Typ-Calciumkanal Calciumporenprotein, das spannungsabhängig aktiviert und eine große (L...large) Leitfähigkeit für Calciumionen besitzt. Vorallem auf Neuronen zu finden

MAC-1 Makrophagenintegrin, bindet an ICAM-1 (CD 54), aus α_M - und β_2 - Untereinheit

MBL Mannan bindendes Lectin auf der Makrophagenoberfläche

MBP Mannose bindende Proteine, gehören zu den IL-1 und IL-6-responsiven Lebersynthetisierten akute-Phase-Proteine, die als Opsonine für Bakterien und andere Erreger wirken und Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen haben

metabotrop Rezeptorproteine der äußeren Zellmembran mit funktioneller Kopplung an Signalübertragungswege, die primär unabhängig von Ionenfluxen über der äußeren Zellmembran sind (i.Ggs. zu ionotrop)

MHC Gewebshistokompatibilitätskomplex, entscheidend für Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und für die Präsentation von körpereigenen und Fremdpeptiden an das Immunsystem

MHC I Gewebshistokompatibilitätskomplex I, auf allen kernhaltigen Zellen

MHC II Gewebshistokompatibilitätskomplex II, überwiegend auf lymphatischen Zellen und Thymusstroma

mRNA Boten-Ribonukleinsäure (messenger-RNA)

NF-k-B Transkriptionsfaktor, nukleärer Faktor k-B, steht unter der Kontrolle eines inhibitorischen Proteins, I-k-B

NO_x reaktive Nitrat- und Nitritmetabolite, unter physiologischen Bedingungen vorallem freigesetzt von den Stickstoffoxydsynthasen in Neuronen (n-NOS), Endothelzellen (e-NOS) und induzierbaren (i-NOS)

NOAEL	Konzentration eines Stoffes, bei dem gerade kein adverser Effekt in einem experimentellen System beobachtbar ist (no observed adverse effect level)
NOEL	Konzentration eines Stoffes ohne Effekt auf ein experimentelles System
O ₂ ^{-*}	Superoxydanionradikal, entsteht u.a. beim oxidativen Burst zur Pathogenabwehr durch Makrophagen. Substrat für Superoxyddismutase
PC 12 Zellen	Tumorzelllinie aus Nebennierenmarkstumor (Phäochromozytom, PC)
PCBs	Polychlorierte Biphenyle
PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
Phospholipasen C und D	Sekundärsysteme verschiedener metabotropher Rezeptoren, die die zweiten Botenstoffe Inositoltriphosphat, IP ₃ , und Diacylglycerol, (DAG, von PLC) und Phosphatidylsäure, (PA, von PLD) erzeugen
PKC	Proteinkinase C, ein Enzymsystem, das durch Diacylglycerol aktiviert die Funktionszustände vieler zellulärer Proteine wie Rezeptoren, Kinasen und Lipasen ändern kann
ppm	1mg/l parts per billion, entspricht einem Zuckerwürfel pro Schwimmbad
ppb	1µg/l parts per million, entspricht einem Zuckerwürfel pro ein Tanker
ppt	1ng/l parts per trillion, entspricht einem Zuckerwürfel pro mittlere Talsperre
Purin- und Pyrimidinrezeptoren	Oberflächenrezeptoren für Purinbasen und Pyrimidinbasen und deren Derivate, die in zwei Familien unterteilt werden (s. Einleitung):P1- für vorallem ADP und P2-Rezeptoren mit ATP- Spezifität
RNA	Ribonukleinsäure (von engl. ribonucleic acid)
sperm account	Spermienzahl, Parameter für reproduktionstoxikologischen Befunde
spinning syndrome	Verhaltensänderung vorallem bei Nagern nach Intoxikation mit polyhalogenierten Dibenzodioxinen und Biphenylen, das zurückgeht auf zentralnervöse Störungen und Veränderungen der neuro-muskulären Kopplung (Cholinerges System)
SRBC-Test	Immunfunktionstest, beruht auf der Fähigkeit immunkompetenter T-Zellen, allogene Zellen (rote Blutkörperchen vom Schaf) in Kultur zu erkennen und zu lysieren (Plaquetest), sheep-red-blood-cell-Test
substantia nigra	einer der subcorticalen Nuclei, beteiligt unter anderem an Bewegungskontrolle, neuronale Eingänge von Neocortex, Ausgänge über Hypothalamus zu Frontallappen

T3	Trijodthyronin
T4	Jodthyroxin
TCDD	Tetrachlordibenzodioxin
T _H 1	T-Helferzellen der Subpopulation 1, die vorallem makrophagenspetifische Immunfunktionen erfüllen
T _H 2	T-Helferzellen der Subpopulation 2, vorallem B-Zell gestützte Immunfunktionen
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha, wichtigstes proinflammatorisches Cytokin (Catechin) nach Endotoxin
T-Zellen	(Thymuszellen) immunkompetente Zellen mit Thymus als Selektions- und Differenzierungsort
U 73122	Hemmstoff der Agonisten-induzierten Phospholipase C Aktivierung mit einem IC ₅₀ von 1.0 bis 2.1 μ M in humanen Plättchen und Neutrophilen und Hemmstoff der Polymorphkernigen Neutrophilen Adhäsion an biologische Oberflächen mit einem IC ₅₀ = 50nM. Chemischer Name: 1-[6-(17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17yl)-Amino)Hexyl]-1H-Pyrrol-2,5-Dion (C ₂₉ H ₄₀ N ₂ O ₃)
U 73434	Analogon des U 73122, das als nur schwacher Inhibitor der Phospholipase C fungiert chemischer Name: 1-[6-((17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17yl)-Amino)Hexyl]-2,5-Pyrrolidindion (C ₂₉ H ₄₂ N ₂ O ₃)
VLDL	lebersynthetisierte Lipoproteine sehr geringer Dichte (very low density lipoproteins), die Leberlipide im Körper verteilen
wasting-syndrome	genereller körperlicher Verfall bei Versuchstieren nach PCB-Exposition, einhergehend mit Gewichtsverlust infolge verringerter Nahrungsaufnahme
Yusho	Reisölkrankheit, geht auf einen GAU (größter anzunehmender Unfall) in einer Reisöl-produzierenden Fabrik zurück, in der große Mengen Reisöl mit PCB-Gemischen kontaminiert wurden und in den Handel gelangten
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für finanzielle Unterstützung des Projektes dem Graduiertenkolleg Toxikologie und Umwelthygiene unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahl dem medizinische Institut für Umwelthygiene und der Abteilung Neuro- und Verhaltenstoxikologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerd Otto Winneke

den Herren

Prof. Dr. Herbert Wiegand	für die Betreuung der Arbeit, kritische Einwände und die nachmittägliche Diskussionstunde
Prof. Dr. Frank Wunderlich	für kritische Anregungen, wohlwollende Begutachtung und altmittelhochdeutschen Dialekthumor
Prof. Dr. Durisalah Desai	für Rat und Tat
Prof. Dr. Tomas Guilarte	für die Möglichkeit, ein Vierteljahr an der Johns Hopkins Universität in Baltimore arbeiten zu dürfen

unseren technischen Assistentinnen und Assistenten:

Irene Nahleway
Carolina Sveinsson
Erika Müller
Hildegard Schardt
Karlheinz Redelings

für exzellente technische Unterstützung und Durchhalteparolen

Dr. Ulf Bickmeyer für die Einarbeitung in patch-clamp-Technik und Spektrofluorimetrie

Prof. Dr. Albrecht Wendel für das Aufzeigen beruflicher Perspektiven

Dr. Karl-Heinz Wasner und Dr. Fritze Kopp für Ratschläge, gute Ideen und Wein

der Abteilungen für experimentelle Toxikologie und Toxikologie von Fasern und Stäuben am medizinischen Institut für Umwelthygiene unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Abel, speziell Prof. Dr. Paul Borm, Frau Dr. Kathrin Albrecht und Frau Dr. Doris Höhr, sowie den Herren Dr. Roel Schins und Ad Knaapen

für Starthilfen und Anwendungsfragen

meiner Freundin Heike für Geduld, Nachsicht, Heiterkeit und Kaffee

Dr. Heinz-Dieter Held für ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen der Arbeit

meinen Eltern Norbert und Inge für die Unterstützung des Studiums, der Ausbildung und Hilfe in allen Lebenslagen