

Aus dem Bereich Biophysik

Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Etablierung der Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie als
Nachweismethode für die Superoxidproduktion in lebenden Zellen:
Optimierung eines Messprotokolls und Untersuchungen zur Kinetik und
der Rolle von Kalzium bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2019

vorgelegt von: David Vincent Wolfgang Conrad.

geb. am: 25.12.1985 in Saarbrücken.

Tag der Promotion: 30.08.2019

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. M. Hoth

Prof. Dr. M. W. Laschke

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
I. Abbildungsverzeichnis	7
II. Tabellenverzeichnis	8
III. Abkürzungen	9
Kapitel 1 Zusammenfassung	11
Chapter 1 Summary	13
Kapitel 2 Einleitung.....	15
2.1 Radikale.....	15
2.1.1 Reactive Oxygen Species (ROS) und oxidativer Stress.....	15
2.2 Die NADPH-Oxidase Familie.....	18
2.3 Monozyten.....	19
2.3.1 Monozyten im menschlichen Organismus	20
2.4 Kalzium	22
2.4.1 Speicher-gesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (SGCE/SOCE).....	22
2.5 Elektron Spin Resonanz Spektroskopie	23
2.5.1 Physikalische Grundlagen	23
Zeeman-Effekt.....	23
Larmor-Frequenz.....	24
Boltzmann-Verteilung	25
Spin-Hamilton-Operator.....	25
Elektronen-Zeeman-Term	26
Hyperfeinstruktur-Term	26
Kern-Zeeman-Term.....	27
2.5.2 Relaxationsmechanismen	28
Spin-Spin-Relaxation	28
2.5.3 Spin-Trapping und Spinproben	28

2.6 Fragestellung	31
Kapitel 3 Materialien und Methoden.....	32
3.1. Chemikalien und ihre Bezugsquellen.....	32
3.2 Medien und Lösungen	33
3.3 Software, Geräte und Material	34
3.4 THP-1 Monozyten.....	34
3.5 Zellen gesunder humaner Spender	35
3.5.1 Die Isolation der CD14 ⁺ Monozyten.....	36
3.6 ESR-Spektroskopie	36
3.6.1 Aufzeichnung der Spektren	37
Die Cavity	38
3.6.2 Auswertung der Spektren	39
Kalibration zur Bestimmung der Konzentration an ROS.....	40
3.7 Allgemeiner Versuchsaufbau	41
3.7.1 Die Reagenzien.....	41
3.7.2 Allgemeiner Versuchsaufbau.....	42
3.8 Messreihen und Zielgrößen	43
3.8.1 Experimente ohne Zellen.....	43
Experimente zum Vergleich der Spinproben:	43
Experimente zum Vergleich verschiedener Messlösungen:.....	43
3.8.2 Experimente mit THP-1 Zellen	44
3.8.3 Experimente mit humanen CD14 ⁺ Monozyten	44
3.9 Auswertung und Statistik	46
Kapitel 4 Ergebnisse.....	47
4.1 Die Spinprobe.....	47
4.2 Die Messlösung und Messbedingungen	48
4.3 ESR-Messungen an THP-1 Monozyten	52

4.4 ESR-Messungen an CD14 ⁺ Monozyten von gesunden menschlichen Spendern.....	54
4.5 Kalziumabhängige Superoxidradikalproduktion.....	57
Kapitel 5 Diskussion	61
5.1 Methodik und Rahmenbedingungen	61
5.2 ESR-Messungen an THP-1 Monozyten und Vergleich der Kinetik mit den frischen CD14 ⁺ Monozyten.....	65
5.3 ESR-Messungen an Monozyten von gesunden menschlichen Spendern und kalziumabhängige (SOCE-abhängige) Superoxidradikalproduktion.....	67
5.4 Abschluss und Ausblick	70
Kapitel 6 Literaturverzeichnis	72
Kapitel 7 Publikationen und Danksagungen	81
7.1 Veröffentlichungen.....	81
7.2 Danksagungen	82

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ROS – Ursprung, Reaktionskaskaden und Interaktionen.....	17
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der NADPH-Oxidase (NOX).....	19
Abbildung 3: ROS-Produktion durch die NOX2.	21
Abbildung 4: Reaktionsschema der Spinprobe CMH mit einem Superoxidradikal.	31
Abbildung 5: Messlabor und Messplatz.	37
Abbildung 6: Prinzipieller Aufbau eines ESR-Spektrometers.	38
Abbildung 7: Magnetfeldmodulation des ESR-Signals.	38
Abbildung 8: Typisches Nitroxid-Radikal Spektrum von CMH und CPH.....	40
Abbildung 9: Das typische Signal des stabilen Tempolradikals.	40
Abbildung 10: Vergleich der Spinproben CMH (schwarz) und CPH (blau) bei 22°C bei Superoxidproduktion durch das X/XO-System.....	48
Abbildung 11: Eigensignal der Messlösungen mit CMH bei 22°C.	49
Abbildung 12: Vergleich der Hintergrundsignale der Messlösungen bei 22°C (schwarz) und 37°C (rot).....	50
Abbildung 13: Eigensignal der CMH-Stocklösungen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen.....	51
Abbildung 14: Superoxidproduktion der THP-1-Monozyten bei 37°C.	53
Abbildung 15: Temperaturabhängigkeit der ROS-Produktion von THP-1 Monozyten.	53
Abbildung 16: Superoxidproduktion von CD14 ⁺ Monozyten bei 37°C (Teil 1).	55
Abbildung 17:Superoxidproduktion CD14 ⁺ Monozyten bei 37°C (Teil 2).	56
Abbildung: 18 Superoxidproduktion CD14 ⁺ Monozyten mit und ohne extrazelluläres Kalzium im Vergleich nach PMA-Stimulation.....	57
Abbildung 19: Kinetik der Superoxidproduktion stimulierter und nicht stimulierter Monozyten.....	58
Abbildung 20: Superoxidproduktion der mit Thapsigargin stimulierten Monozyten.....	59
Abbildung 21: Vergrößerte Darstellung der Stimulation mit Thapsigargin aus Abb.20.	60

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spinproben und ihre Eigenschaften.....	30
Tabelle 2: Chemikalien und die Bezugsquelle	32
Tabelle 3: Pipettierschema: Vergleich CMH und CPH.....	43
Tabelle 4: Pipettierschema: Vergleich verschiedener Pufferlösungen.....	43
Tabelle 5: Pipettierschema: Experimente mit THP-1 Monozyten	44
Tabelle 6: Pipettierschema, CD14 ⁺ Monozyten in 1mM Ca ²⁺ Lösung.....	45
Tabelle 7: Pipettierschema, CD14 ⁺ Monozyten in 1mM Ca ²⁺ Lösung + BisGö und 4a-PDD	45
Tabelle 8: Pipettierschema, CD14 ⁺ Monozyten in 1mM -und 0mM Ca ²⁺ Lösung	46
Tabelle 9: Pipettierschema, CD14 ⁺ Monozyten in 1mM Ca ²⁺ Lösung nach Tg-Zugabe	46

III. Abkürzungen

4-POBN	α -(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron
Abb	Abbildung
ACP	1-Acetoxy-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
AU	Arbitrary Unit
CAT1H	1-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl-trimethylammoniumchloride
CD	Cluster of Differentiation
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
CPH	1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin
CT	Conversion Time
DEPMPO	5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide
DETC	Diethylthiocarbamat
DF	Desferoxamin
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodoniumchlorid
DUOX	Dual-Oxidase
EMPO	5-(Ethoxycarbonyl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxide
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESR	Elektron Spin Resonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
Glg	Gleichung
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HLPC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LPS	Lipopolysaccharid
LRS	Leukozyten-Reduktion-System
MA	Magnetfeldmodulations-Amplitude
MPC	Mononukleäre Phagozytenzelle
MPO	Myeloperoxidase

MWL	Mikrowellenleistung
NaCl	Natriumchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOX	NADPH-Oxidase/ Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBN	N-tert-Butyl-a-phenylnitron
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKC	Proteinkinase C
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPH	1-Hydroxy-4-phosphono-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel
RNS	Reactive Nitrogen Species – Reaktive Stickstoff Spezies
ROS	Reactive Oxygen Species – Reaktive Sauerstoff Spezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RS	Reaktive Spezies
SE	Standardfehler
SERCA	Sarkoplasmatisch/endoplasmatische Kalzium-ATPase
SGCE/SOCE	Speichergesteuerter Kalziumeinstrom/ Store Operated Calcium Entry
SOC	Store-operated channels
SOD	Superoxid-Dismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TC	Time Constant
Tg	Thapsigargin
X	Xanthin
XO	Xanthinoxidase

Kapitel 1 Zusammenfassung

Hintergrund: Atome und Moleküle, die ein ungepaartes Elektron besitzen, werden in der Chemie als Radikale bezeichnet. Im Organismus entstehen sie sowohl als Endprodukt einer gezielten Reaktion, als auch als Nebenprodukt einzelner Stoffwechselfvorgänge. Alle Radikale haben eine hohe Reaktionsfreudigkeit und die damit verbundene meist sehr kurze Lebensdauer gemeinsam. Radikale und Moleküle, die sich durch schrittweise Reduktion von Sauerstoff ableiten und stark oxidierend wirken beziehungsweise leicht weitere Radikale bilden, werden als reaktive Sauerstoffspezies oder „Reactive Oxygen Species“ bezeichnet. Diese können im menschlichen Organismus aus einer Vielzahl von Reaktionen und Quellen entstehen. Eine der wichtigsten Quellen ist das Enzym NADPH-Oxidase. Je nach Lokalisation, Konzentration und Art der reaktiven Sauerstoffspezies, können diese als Botenstoff in Signalwegen des Organismus oder „Abwehrtoxin“ in der angeborenen Immunantwort dienen. Treten sie allerdings gehäuft und ungezielt zum Beispiel in der Pathogenese der Atherosklerose auf, sind sie als körperschädliches Toxin anzusehen. Vor diesem Hintergrund sind das genaue Messen zum einen, und das Verständnis der physiologischen Vorgänge in der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies zum anderen bedeutend. Monozyten besitzen große Mengen des Enzyms NADPH-Oxidase und produzieren signifikante Mengen an Sauerstoffradikalen während der Immunantwort. Bislang stellen die genaue Quantifizierung und die Reaktionskinetik der Radikalentstehung eine große Herausforderung dar.

Methode: Die Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie kann Radikale, aufgrund des Spins ihres ungepaarten Elektrons, selektiv messen. In dieser Arbeit wurden die Reaktionskinetik und Produktion von Sauerstoffradikalen durch Monozyten mit Hilfe zyklischer Hydroxylamine und der Elektron Spin Resonanz Spektroskopie untersucht. Es wurden THP-1 Monozyten und CD14⁺ Monozyten gesunder menschlicher Spender verwendet. Diese wurden mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat und Thapsigargin stimuliert. So konnte die Superoxidradikalproduktion nach Aktivierung der NADPH-Oxidase über verschiedene Signalwege untersucht werden. Das Identifizieren des Radikals als Superoxid ließ sich über ein Unterdrücken des Messsignals mit Superoxid-Dismutase erreichen.

Ergebnis: Ringerpuffer scheint der beste Messpuffer für die Messungen von Zellen mit Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie zu sein. Hier konnte bei möglichst physiologischer Zusammensetzung das geringste störende Hintergrundsignal detektiert werden. THP-1 Monozyten produzieren unter gleichen Bedingungen deutlich weniger Superoxidradikale als die CD14⁺ Monozyten gesunder menschlicher Spender. Außerdem konnte gezeigt werden,

dass Phorbol-12-myristat-13-acetat bei Monozyten eine sechsmal höhere Produktionsrate an Superoxidradikalen induziert als Thapsigargin. Ferner ist diese höhere Produktionsrate komplett unabhängig von der extrazellulären Kalziumkonzentration. Thapsigargin hingegen stimuliert die Radikalbildung in Monozyten absolut kalziumabhängig. Auch die Kinetik ist eine völlig andere. Anders als die Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat, welche zunächst eine lineare Reaktionskinetik und nach Verbrauch des Substrates Sauerstoff eine Sättigung zeigt, weist die Stimulation mit Thapsigargin eine sigmoidale Kinetik auf.

Schlussfolgerung: Es ist gelungen, ein Messprotokoll zu erstellen, das es unserer Arbeitsgruppe erlaubt, Sauerstoffradikale zu quantifizieren und ihre Reaktionskinetik zu beschreiben. Thapsigargin induziert alleine durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Bildung von Superoxidradikalen. Diese kann durch Hemmung der NADPH-Oxidase ebenso wie durch das Hemmen der Proteinkinase C unterdrückt werden. Auch das Entfernen des extrazellulären Kalziums verhindert die Superoxidproduktion durch Thapsigargin. Allein durch die Methode der Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie konnte somit gezeigt werden, dass der kalziuminduzierte Kalziumeinstrom auch in Monozyten eine Hauptrolle in der Regulation und Aktivierung der NADPH-Oxidase einnimmt.

Chapter 1 Summary

Background: Atoms and molecules that carry an unpaired electron are called radicals in chemistry. In the organism, they are formed as the end product of a targeted reaction and as a by-product of individual metabolic processes. All radicals have a high reactivity and a very short lifetime in common. Radicals and molecules, which are derived from sequential reduction of oxygen and show a strong oxidizing effect or easily are forming further radicals, are called "Reactive Oxygen Species". These can arise in the human organism from a multitude of reactions and sources. One of the most important sources is the enzyme NADPH oxidase. Depending on localization, concentration and type of reactive oxygen species, they serve as messenger substances in signaling pathways of the organism or as "defence toxins" in the innate immune response. However, if they occur frequently and uncontrolled, for example in the pathogenesis of atherosclerosis, they are regarded as body-damaging toxins. Against this background, the exact measurement on the one hand and the understanding of the physiological processes in the development of the reactive oxygen species on the other hand are important. Monocytes possess large amounts of the enzyme NADPH oxidase and produce significant amounts of oxygen radicals during the immune response. Precise quantification and understanding the reaction kinetics of radical formation still pose a major challenge.

Methods: Electron spin resonance spectroscopy can selectively measure radicals due to the spin of their unpaired electron. In this thesis, the reaction kinetics and the production of oxygen radicals by monocytes, using cyclic hydroxylamines and electron spin resonance spectroscopy, were investigated. THP-1 monocytes and CD14⁺ monocytes from healthy human donors were used. These were stimulated with the phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate and thapsigargin. Thus, superoxide radical production after activation of NADPH oxidase via various signaling pathways could be investigated. The identification of the radical as superoxide could be achieved by suppressing the measured signal with superoxide dismutase.

Result: Ringer's buffer seems to be the best measuring buffer for cell measurements with electron spin resonance spectroscopy. This buffer caused the smallest disturbing background signal and had a composition that was as physiological as possible. THP-1 monocytes produce significantly less superoxide radicals under the same conditions as the CD14⁺ monocytes of healthy human donors. In addition, our results indicate that the production rate of superoxide after PMA stimulation is six-fold higher than that after stimulation with thapsigargin. Furthermore, this higher production rate is completely independent of extracellular calcium concentration. Thapsigargin, on the other hand, stimulates the formation

of radicals in monocytes absolutely dependent on calcium. The kinetics are also completely different. Unlike stimulation with PMA, which initially has a linear reaction kinetics and shows saturation after consumption of the substrate oxygen, stimulation with Thapsigargin has a sigmoidal kinetics.

Conclusion: We have succeeded in establishing a measurement protocol that allows our research group to quantify oxygen radicals and describe their reaction kinetics. Thapsigargin induces the formation of superoxide radicals by increasing the intracellular calcium concentration alone. This can be suppressed by inhibition of NADPH oxidase as well as by inhibition of protein kinase-C. Removal of extracellular calcium also prevents superoxide production by thapsigargin. Using electron-spin resonance spectroscopy as the main tool, we showed that store-operated calcium entry plays a major role in the regulation and activation of NADPH oxidase in monocytes.

Kapitel 2 Einleitung

2.1 Radikale

In der Chemie werden Atome oder Moleküle, die mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen als Radikale bezeichnet. Sie sind meist extrem reaktionsfreudig, kurzlebig und können durch verschiedene Reaktionen entstehen:

- Verlust eines Elektrons: $A - e^- \rightarrow \cdot A^+$
- Addition eines Elektrons: $B + e^- \rightarrow \cdot B^-$
- Homolytische Spaltung: $X:Y \rightarrow \cdot X + \cdot Y$

(Das Radikal wird durch vorangestellten bzw. nachgestellten Superskript \cdot gekennzeichnet)

Im Organismus entstehen sie sowohl ständig als Nebenprodukt von Stoffwechselfvorgängen, z.B. in Mitochondrien während der Atmungskette oder bei Reaktionen von Cytochrom P450, als auch als gezieltes Endprodukt enzymatischer Reaktionen.

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit Superoxidradikalen, deren Bildung durch das Enzym NADPH-Oxidase und besonders deren Messung und Quantifizierung mit der Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie. Die folgenden Kapitel sollen einen Überblick über die Grundlagen und Relevanz reaktiver Sauerstoffspezies und ihrer enzymatischen Bildung durch die NADPH-Oxidase, vor allem in Monozyten, liefern. Anschließend wird die hier genutzte spektroskopische Messmethode erklärt und ihre Relevanz für die Messung freier Radikale beleuchtet. Am Ende der Einleitung folgt die Formulierung der wissenschaftlichen Fragen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen.

2.1.1 Reactive Oxygen Species (ROS) und oxidativer Stress

Durch Redoxreaktionen und Folgereaktionen von Sauerstoff abgeleitete Produkte sind entweder Radikale (z.B. Superoxid, Hydroxylradikal) oder wirken stark oxidierend und bilden leicht weitere Radikale (z.B. Ozon, Wasserstoffperoxid H_2O_2). Sie werden als Reactive Oxygen Species (ROS) bezeichnet [34,57].

Die Bildung reaktiver Sauerstoff Spezies umfasst gewöhnlich eine ganze Kaskade unterschiedlichster Reaktionen (Abbildung1). Am Anfang dieser Kaskade steht die für diese Arbeit elementare Superoxidproduktion. Das Radikal Superoxid ($\cdot O_2^-$) kann eine Reihe unterschiedlicher Reaktionswege eingehen.

Es dismutiert beispielsweise entweder spontan oder durch katalytische Reaktion zu H_2O_2 , oder aber reagiert mit dem Radikal Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) zu Peroxynitrit, welches zusammen mit Stickstoffmonoxid zu der Reactive Nitrogen Species (RNS) zählt [57].

Diese reaktiven Spezies (RS) können mit einer großen Anzahl organischer und anorganischer Moleküle interagieren. So sind sie in der Lage unter anderem Lipide, Proteine und DNS irreversibel zu zerstören oder in ihrer Funktion einzuschränken [57,96,107].

Jedoch entstehen die reaktiven Sauerstoffspezies nicht ausschließlich im menschlichen Organismus. Exogene Faktoren wie UV-Strahlung, verschiedene Chemikalien aus der Umwelt, oder sogar zusätzliche Sauerstoffzufuhr über Masken und Nasensonden oder invasiver Beatmung während medizinischer Behandlung führen ebenfalls zu einer erhöhten ROS-Konzentration im Körper [6,36,75].

Der gesunde Organismus besitzt verschiedene Mechanismen, die ihn vor den aggressiven, vornehmlich oxidierenden Radikalen schützen. Zum einen findet man in Zellen so genannte Antioxidantien, also Moleküle, die Radikale abfangen können und zum anderen eine Reihe von Proteinen, wie beispielsweise die Superoxid-Dismutase (SOD), welche die Radikale zu weniger reaktiven Molekülen umwandeln können. Ein weiterer Schutzmechanismus der Zellen vor den Auswirkungen der Reaktionen der Radikale besteht in der Reparatur beispielsweise beschädigter DNS-Abschnitte und dem Abbau beschädigter Proteine.

Die Produktion und Abwehr der ROS innerhalb des Organismus befindet sich also in einer Art Gleichgewicht. Dauernd werden Radikale frei und in für die Zellen ungefährlichere Substanzen umgewandelt. Ist das Gleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen gestört und besteht die potentielle Gefahr einer Zellschädigung, so spricht man von oxidativem Stress [85].

Dieser kann ebenso aus einem Mangel an antioxidativen Molekülen oder schützenden Enzymen resultieren, wie aus einer gesteigerten Produktion von ROS, beispielsweise bei einer unangemessenen Aktivierung von Phagozyten bei einer chronisch entzündlichen Erkrankung. Konsequenzen eines gestörten Gleichgewichts mit resultierendem oxidativem Stress können sein:

- Gesteigerte Zellproliferation
- Schädigung der Zellen
- Arterielle Vasokonstriktion
- Zelltod durch Apoptose oder Nekrose

So werden den Radikalen mittlerweile wichtige Rollen bei zahlreichen Erkrankungen und dem Alterungsprozess zugeschrieben. [27,45,62,86,96,103].

Wie bereits erwähnt gibt es im menschlichen Organismus auch einige spezialisierte Enzymsysteme, welche in der Lage sind effektiv ROS zu produzieren. Diese, meist nach einem Stimulus erzeugten ROS und Radikale, spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort (Kapitel 2.3), können aber auch wichtige Aufgaben in der Signaltransduktion übernehmen [5,34,96,99,108]. So sind sie zum Beispiel in der Lage, über Oxidation Protein-Tyrosinkinasen zu aktivieren und Protein-Phosphatasen zu inaktivieren [19]. Die reaktiven Sauerstoffspezies interagieren durch Oxidation je nach Protein an verschiedenen chemischen Gruppen und Verbindungen und sind beispielsweise an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt oder modifizieren Schwefel- und Cysteinreste. Durch diese Interaktionen mit Proteinen und Enzymen dienen die ROS selbst als Signalmolekül [11,42,76,81,106].

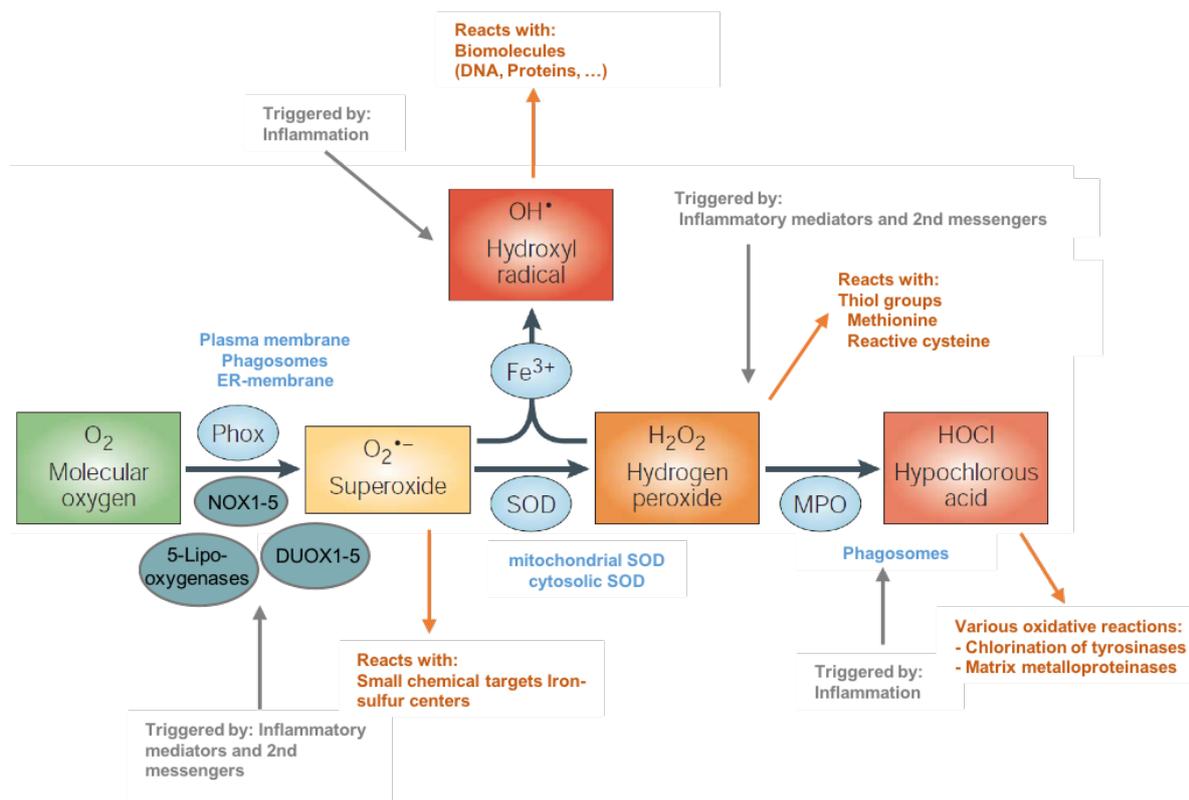


Abbildung 1: ROS – Ursprung, Reaktionskaskaden und Interaktionen.

Gezeigt wird der Ursprung reaktiver Sauerstoffspezies in menschlichen Immunzellen. Der erste Schritt ist die Umwandlung von molekularem Sauerstoff in Superoxidradikale. Die verschiedenen Interaktionen und Reaktionen, die nun folgen können, sind mit den Pfeilen zwischen den Kästen dargestellt. Die an den jeweiligen Reaktionen beteiligten Enzyme und Kofaktoren sind in den blauen Ellipsen abgebildet. Der blaue Text gibt den Ort der beteiligten Enzyme an. Auslöser für die Produktion der dargestellten ROS sind grau dargestellt und weisen mit ihren grauen Pfeilen auf die jeweilige Reaktion hin. Die Pfeile in orange weisen auf die Interaktionen und Reaktionen der jeweiligen reaktiven Sauerstoffspezies hin. Der Farbumschlag der Kästen von Grün zu Rot weist auf die unterschiedliche Reaktionsfreudigkeit bzw. Schädlichkeit hin, wobei grün wenig reaktionsfreudig ist und rot für eine hohe unspezifische Reaktionsfreudigkeit steht. Das Bild wurde entnommen und angepasst aus der Dissertation von S. Saul [82] sowie [57], die Informationen über die Ursprünge der ROS stammen aus [8].

2.2 Die NADPH-Oxidase Familie

Eines der wichtigsten Beispiele eines Enzymsystems, das ROS als Hauptprodukt produziert, ist die phagozytäre NADPH-Oxidase (NOX) und Dual-Oxidase Familie (DUOX). Insgesamt besteht die Enzymfamilie aus sieben Mitgliedern, der NADPH-Oxidase 1-5 und der Dual-Oxidase 1-2. Alle Familienmitglieder sind Transmembranproteine mit der Fähigkeit Elektronen durch biologische Membranen zu transportieren und letztendlich Sauerstoff zu Superoxid zu reduzieren (Abbildung 2).

Im Fokus dieser Arbeit steht vornehmlich der auch als gp91^{phox} bezeichnete Prototyp der NADPH-Oxidase NOX2. Häufig nennt man sie auch phagozytäre NOX, was nach heutiger Sicht nicht ganz ausreichend ist. Zunehmend gibt es Beweise für eine Expression auch in nicht phagozytären Zellen, wie Kardiomyozyten, Neuronen, Hepatozyten und Endothelzellen. In Phagozyten befindet sich die NOX2 sowohl in der Plasmamembran als auch intrazellulär in der Vesikelmembran, immer jedoch in enger Assoziation mit der stabilisierenden Untereinheit p22^{phox} [5,57]. Da in dieser Arbeit die Aktivierung der NOX2 und die daraus resultierende ROS-Produktion mittels Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie untersucht wird, soll dieses Enzym nachfolgend genauer betrachtet werden. Wie oben beschrieben besteht die NOX2 aus verschiedenen Einheiten, welche vor der Aktivierung voneinander getrennt sind. Das komplette Holoenzym besteht nach der Aktivierung aus der für den Elektronentransport verantwortlichen katalytischen Grundeinheit gp91^{phox}, dem Membranprotein p22^{phox} (gemeinsam Flavocytochrom b588), den drei dem Zytosol zugewandten Einheiten p47^{phox}, p67^{phox} und p40^{phox}, sowie der kleinen GTPase RAC und zwei Mitgliedern der S100 Proteinfamilie [5,14,53,100]. Die Nomenklatur erklärt sich aus „p“ für Protein mit dem nachfolgenden Molekulargewicht (Zahl), sowie dem Zusatz „phox“, welcher die Zugehörigkeit zur Phagozytenoxidase angibt.

Kommt es nun zu einer Aktivierung des Phagozyten, zum Beispiel durch einen pathogenen Mikroorganismus, wird das Enzym aus den verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt (siehe auch Abbildung 3). Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt über die Proteinkinase C zur Phosphorylierung der Untereinheit p47^{phox} und damit zur Bindung der mit dieser Einheit assoziierten p67^{phox} und p40^{phox} an das Membranprotein p22^{phox} und dessen Lipidanker. Ebenso ist die Translokation und Bindung der S100 Proteinuntereinheiten kalziumvermittelt. Die kleine GTPase RAC dissoziiert während der Zellaktivierung von dem Inhibitor RhoGDI und bindet nach Nukleotidaustausch in der aktiven Form (GTP) an die Untereinheit p67^{phox}. In der letztendlichen Bildung der Superoxidradikale fungiert NADPH als Elektronendonator zweier Elektronen auf zwei Sauerstoffmoleküle [5,35,53,57].

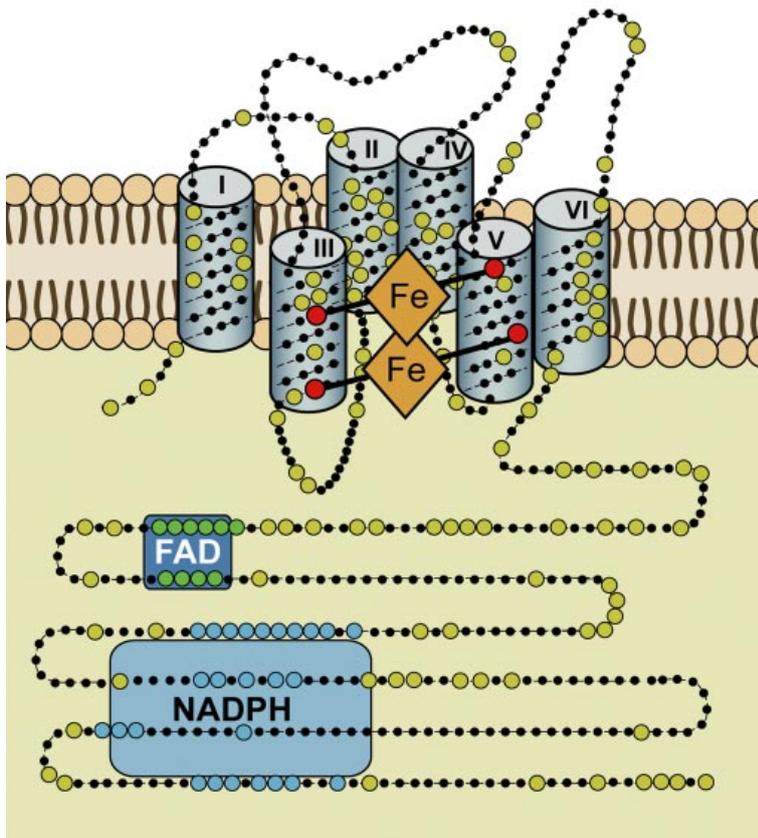


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der NADPH-Oxidase (NOX).

Vom Carboxyl-Ende beginnend: Eine NADPH Bindungsstelle, eine FAD Bindungsstelle, sechs Transmembrandomänen sowie vier hämbindende Histidine an der dritten und fünften Transmembrandomäne. Die Enzyme der NOX-Familie transportieren Elektronen einzeln durch biologische Membrane. Das Bild wurde entnommen aus [5].

2.3 Monozyten

Monozyten sind Leukozyten und gehören zur angeborenen Immunantwort. Eine der Hauptaufgaben der Zellen des angeborenen Immunsystems ist die Abwehr schädlicher Krankheitserreger. Außerdem sind sie, zum Beispiel durch Antigenpräsentation oder Mediatorausschüttung, Vermittler der erworbenen Immunantwort. Zusammen mit Makrophagen und dendritischen Zellen werden Monozyten als mononukleäre Phagozytenzellen (MPCs) bezeichnet. Monozyten erfüllen auf zellulärer und humoraler Ebene drei Hauptfunktionen: die Beseitigung von Krankheitserregern durch Phagozytose und Produktion von Zytokinen, die Immunmodulation durch Mediatoren (Interleukine) und das Präsentieren von Antigenen [2,23,38].

Etwa 10% der Leukozyten des menschlichen Blutes sind Monozyten. Sie kommen sowohl im Blut als auch im Knochenmark und in der Milz vor, können aber auch in verschiedene Gewebe einwandern.

Trotz ihrer Unterschiede in Größe und Form zeigen alle Monozyten typische morphologische Merkmale, wie einen ovalen Kern, Vesikel im Zytoplasma und ein hohes Zytoplasma-Kern-Verhältnis [23,49,73].

Entsprechend ihrer Vielseitigkeit weisen Monozyten mindestens drei verschiedene Phänotypen auf und werden unterteilt in klassische (oder entzündliche), nicht-klassische und intermediäre Monozyten [112]. Monozyten sind mit einer Vielzahl von Chemokin- und Adhäsionsrezeptoren ausgestattet. Diese dienen der Migration aus dem Blut in das umliegende Gewebe während einer Infektion und sind an der Zellaktivierung beteiligt. Außerdem werden die verschiedenen Rezeptoren zur Klassifizierung der Subtypen verwendet. Das Hauptmerkmal der Monozyten, welches diesen Zelltyp von anderen Leukozyten unterscheidet, ist die Expression des CD-Moleküls CD14. Die charakteristische Expression der Fc γ Rezeptoren I (CD64) und III (CD16) wird dagegen zur Unterscheidung der verschiedenen Subtypen verwendet [40,79,94].

2.3.1 Monozyten im menschlichen Organismus

Eine der Hauptaufgaben von Monozyten ist die Abwehr infektiöser Erreger. Als Phagozyten sind Monozyten in der Lage, nach Aktivierung (durch spezielle Oberflächenmoleküle und Rezeptoren), pathogene Mikroorganismen oder apoptotische Zellen aufzunehmen und diese zu beseitigen. Dies geschieht, indem der aufgenommene Mikroorganismus in einem Vesikel, dem Phagosom, eingeschlossen wird. Im weiteren Verlauf verschmelzen die Phagosomen mit Lysosomen zu einem Phagolysosom. Der Krankheitserreger wird mittels verschiedener Substanzen und in einem pH von ungefähr 5 – 5,5 verdaut [43,63,69].

Während der Abwehr von pathogenen Keimen kommt es zu einem sprunghaften Anstieg der ROS-Bildung, dem oxidativen oder respiratorischen Burst. Dieser essentielle Schritt in der Bekämpfung von Krankheitserregern durch MPCs dient, wie in Kapitel 2.1 besprochen, nicht nur der direkten Zerstörung der Erreger, sondern bereitet durch die Funktion der ROS als Signalmolekül weitere Schritte in der Immunabwehr vor [15,97,104].

Die Produktion von Superoxidradikalen und weiteren ROS während des oxidativen Bursts ist hauptsächlich auf die NOX2 zurückzuführen. Monozyten exprimieren große Mengen dieses Enzyms und eignen sich folgerichtig zur genaueren Untersuchung der Vorgänge während der ROS-Produktion (Abbildung 3); (siehe auch Kapitel 2.2).

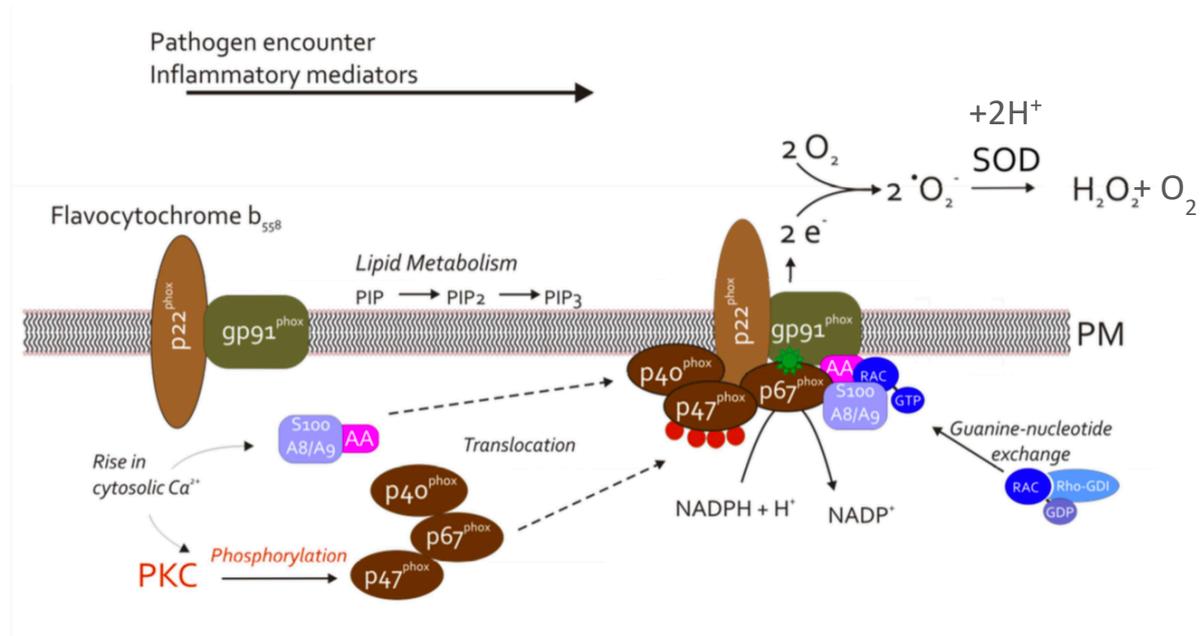


Abbildung 3: ROS-Produktion durch die NOX2.

Kommt es zu einer Aktivierung der NOX2 in Phagozyten, muss das Holoprotein aus den verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt werden. Das Bild zeigt, wie die membranständige Untereinheit Flavocytochrom b588 ($gp91^{phox}$ und $p22^{phox}$) nach Aktivierung und durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration mit den weiteren Komponenten aus dem Zytosol zusammengesetzt werden. Der Anstieg der Kalziumkonzentration im Zytosol führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und folgend auch zu einer Phosphorylierung der Untereinheit $p47^{phox}$. Hierdurch binden die Untereinheiten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und $p40^{phox}$ an $p22^{phox}$. Diese Bindung entsteht durch PIP_2 -Lipidanker. Zum anderen führt der Anstieg der Kalziumkonzentration zu einer Translokation und Bindung der S100 Proteinuntereinheiten. Weiterhin gezeigt ist, wie die kleine GTPase RAC während der Aktivierung von dem Inhibitor RhoGDI nach Nucleotidaustausch (GDP zu GTP) dissoziiert und an die Untereinheit $p67^{phox}$ bindet. Zur Produktion der Superoxidradikale fungiert nun NADPH als Elektronendonator. Die Elektronen werden über die katalytische Untereinheit, $gp91^{phox}$ (grüne Sonne), auf molekularen Sauerstoff übertragen. Häufig werden diese Radikale zügig von der Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Das Bild wurde übernommen und angepasst aus [57] und der Dissertation von S. Saul [82]. Informationen der Vorgänge stammen aus [5,14,35,53,91].

Trotz ihrer wichtigen Rolle in der Immunantwort auf verschiedene Krankheitserreger tragen Monozyten durch die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen und ROS auch zur Pathogenese nicht infektiöser Entzündungen, respektive entzündlicher Erkrankungen wie Atherosklerose und rheumatoider Arthritis, bei. So ist das Einwandern von Monozyten in atherosklerotische Läsionen und die Bildung von Schaumzellen typisch für die Atherosklerose. Ebenso wird der Prozess durch die Bildung von ROS durch Monozyten und Makrophagen noch beschleunigt [16,37,89,95]. Also sind Monozyten und die von ihnen produzierten ROS im menschlichen Organismus nicht ausschließlich positiv zu sehen. Umso wichtiger ist es, die genauen Vorgänge zu kennen und zu verstehen.

2.4 Kalzium

Kalzium (Ca^{2+}) übernimmt im menschlichen Organismus eine Reihe wichtiger Aufgaben. Die essentiellen Funktionen in der Blutgerinnung und Muskelkontraktion sind hinlänglich bekannt. Ebenso sind Ca^{2+} -Ionen aber auch in der Signalübermittlung als sekundärer Botenstoff von großer Bedeutung. Zellproliferation, Zytokinproduktion, Zelldifferenzierung, aber auch Apoptose sind hierfür wichtige Beispiele [7,21,78]. Die Rolle von Kalzium in der enzymvermittelten ROS-Produktion nach speichergesteuertem Ca^{2+} -Einstrom (SGCE/SOCE) war für diese Arbeit von besonderem Interesse.

Wie auch bei anderen Elektrolyten sind die erheblichen Konzentrationsunterschiede zwischen Extrazellulärraum und Intrazellulärraum sowie zwischen Zytosol und Endoplasmatischem Retikulum/Sarkoplasmatischem Retikulum (ER/SR) (den internen Speichern) Grundvoraussetzung für die Rolle des Ca^{2+} -Ions in der Signaltransduktion.

Diese Konzentrationsunterschiede werden durch eine ganze Reihe verschiedener Membrankanäle und Transportmechanismen aufrechterhalten. Zunächst einmal sorgen zwei ATP verbrauchende Pumpen dafür, die Kalziumkonzentration im Zytosol gering zu halten. Die sarkoplasmatisch/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) sitzt in der Membran des ER und befördert die Kalziumionen aus dem Zytosol in das ER zurück. Ebenso befördert eine Plasmamembran ATPase (PMCA) die Kalziumionen aus dem Zytosol nach extrazellulär.

2.4.1 Speicher-gesteuerter Ca^{2+} -Einstrom (SGCE/SOCE)

Einer der möglichen Wege die Ca^{2+} -Ionen Konzentration im Zytosol zu erhöhen und eine Signalkaskade zu aktivieren, geschieht durch das Öffnen zellmembranständiger Kalziumkanäle durch Kalzium selbst (kapazitative oder speichergesteuerte Kanäle; SOC). Hierzu kommt es zunächst zu einer Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher, an deren Anfang die Aktivierung der Phospholipase C und der daraus folgenden Freisetzung von Inositoltrisphosphat in das Zytosol steht. Inositoltrisphosphat seinerseits führt durch Bindung an einen Rezeptor der ER-Membran zu einem Öffnen von Kalziumkanälen des ER und letztendlich zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen Konzentration aus internen Speichern. Eben dieser Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen Konzentration ermöglicht einen weiteren Kalziumeinstrom von extrazellulär durch die erwähnten speichergesteuerten Kalziumkanäle [1,72].

2.5 Elektron Spin Resonanz Spektroskopie

Erstmals beschrieb E.K. Sawoiskij 1944 die Technik der ESR-Spektroskopie. In einem externen Magnetfeld werden durch selektive Absorption elektromagnetischer Strahlung innerhalb eines Moleküls Übergänge des Elektronenspins von einem energetisch niedrigeren in einen energetisch höheren Zustand erzeugt. Der Unterschied zwischen diesen beiden Energieniveaus ΔE muss mit der Energie des Strahlungsquants bzw. mit einer bestimmten Frequenz übereinstimmen. Es gilt:

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad \text{Glg. 1}$$

wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum und ν die Frequenz der Strahlung ist.

Voraussetzung für die ESR-spektroskopische Untersuchung einer Probe ist dementsprechend, dass ihre Moleküle ungepaarte Elektronen enthalten. Radikale erfüllen diese Eigenschaft, sodass die ESR als wichtigstes Untersuchungswerkzeug darauf angewendet wird [39,90].

2.5.1 Physikalische Grundlagen

Ein Elektron ist neben seiner Masse und Ladung auch durch seinen Spin charakterisiert. Diese (formale) Rotation um die eigene Achse ist eine für die ESR-Spektroskopie besonders wichtige fundamentale Eigenschaft des Elektrons. Im klassischen Bild bewirkt diese Bewegung des Elektrons Ladungsströme, die ein Magnetfeld verursachen, sodass dem Teilchen ein permanentes magnetisches Dipolfeld vergleichbar mit einem Stabmagneten zugeordnet ist. Dieses magnetische Moment kann für die hier betrachteten Anwendungen mit dem Magnetischen Moment des Eigendrehimpulses gleichgesetzt werden:

$$|\mu_e| = -g \cdot \mu_B \cdot |S| \quad \text{Glg. 2}$$

Hierbei ist g die dimensionslose Konstante (Landé-Faktor oder g -Faktor) mit dem Wert 2,00232 für ein freies Elektron, μ_B das Bohr'sche Magneton und S der Spin des Elektrons. Der Landé-Faktor gibt an, um wie viel mehr sich der Spin des geladenen Teilchens im Magnetfeld auf seine Energie auswirkt, als ein gleich großer Bahndrehimpuls [39,90].

Zeeman-Effekt

Betrachtet man freie Elektronen mit ihrem magnetischen Moment in einem homogenen konstanten äußeren Magnetfeld H_0 mit der magnetischen Induktionsflussdichte B_0 , so richten sich die Spins der Elektronen parallel oder antiparallel zu B_0 aus. Die Energie der beiden Orientierungen ist verschieden. Sie ergibt sich aus:

$$E(m_s) = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \cdot m_s \quad \text{Glg. 3}$$

wobei m_s die so genannte Elektronenspinquantenzahl darstellt. Mit dieser Gleichung können alle für m_s möglichen Energieniveaus berechnet werden.

Für den einfachsten Fall $S=1/2$, repräsentiert durch die magnetischen Quantenzahlen $m_s = \pm 1/2$, ergeben sich also folgende zwei Energiezustände:

$$E_+ = E(m_s = 1/2) = 1/2 g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad \text{Glg. 4}$$

$$E_- = E(m_s = -1/2) = -1/2 g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad \text{Glg. 5}$$

Die Differenz der beiden Energieniveaus bei einem B_0 -Feld ist dann die Resonanzbedingung:

$$\Delta E = E_+ - E_- = g \cdot \mu_B \cdot B_0 = h \cdot \nu \quad \text{Glg. 6}$$

Diese energetische Aufspaltung der beiden Spinzustände durch ein äußeres Magnetfeld bezeichnet man als Zeeman-Effekt [39,90].

Larmor-Frequenz

Der Wechsel zwischen den beiden Energieniveaus ist der zentrale Mechanismus der ESR-Spektroskopie. Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung in einem äußeren Magnetfeld kommt es zu einem Übergang von einem Energieniveau in das andere, wobei die zugehörige Absorption der Strahlung das Messsignal darstellt. Bringt man nun Teilchen, die einen Spin besitzen in ein äußeres Magnetfeld, so präzediert dieser Spin ähnlich wie ein mechanischer Kreisel im Schwerfeld der Erde um das Magnetfeld B_0 . Die Umlauffrequenz wird als Larmor-Frequenz bezeichnet:

$$\omega = \gamma \cdot B_0 \quad \text{Glg. 7}$$

Sie hängt von der Stärke des äußeren Magnetfeldes und dem gyromagnetischen Verhältnis γ für das Elektron ab. Multipliziert man Gleichung 7 mit \hbar ($= h/2\pi$), so ergibt sich für ein eingestelltes B_0 -Feld eine Energiegleichung, die mit den Identitäten $\hbar \cdot \gamma = g \cdot \mu_B$ und $\omega = 2\pi \cdot \nu$ die Form von Gleichung 6 annimmt:

$$\hbar \cdot \omega = h \cdot \nu = \hbar \cdot \gamma \cdot B_0 = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad \text{Glg. 7.1}$$

Das heißt, dass exakt bei der Larmor-Frequenz Energie auf die Elektronenspins übertragen werden kann. Betrachtet man die Resonanzbeziehungen (Gleichungen 6 und 7.1), so stellt man fest, dass sich bei einer festgelegten Mikrowellenfrequenz ν (das Energiequant ist festgelegt) und sich änderndem Magnetfeld B (die Aufspaltung der Energieniveaus wird verändert) die Absorption genau an der Resonanzstelle B_0 auftreten wird [39,90].

Mit einem Wert von $\gamma = -1,76 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ für das Elektron ($\text{T} = \text{Tesla}$, SI-Einheit der magnetischen Flussdichte, $1 \text{ T} = 10^4 \text{ Gauss}$) ergibt sich in einem Feld von 1 T eine Larmorfrequenz von etwa 28 GHz . Für die in dieser Arbeit genutzte Frequenz von ca. $9,8 \text{ GHz}$ liegt das Resonanzfeld bei etwa $0,35 \text{ T}$ ($= 3500 \text{ Gauss}$).

Boltzmann-Verteilung

Magnetische Dipolübergänge zwischen den Zeeman-Niveaus sind sowohl vom energetisch niedrigeren ins höhere als auch in umgekehrter Richtung möglich. Auch diese hieraus folgende Gleichberechtigung zwischen Absorptions- und Emissionsprozessen ist durch die Resonanzbedingung (Gleichung 6) beschrieben. Übergänge im System sind nach der Auswahlregel nur dann erlaubt, wenn gilt: $\Delta m_s = \pm 1$.

Im thermischen Gleichgewicht entspricht das Verhältnis der Besetzungszahlen der oberen (n^+) und unteren (n^-) Energieniveaus der Boltzmann-Verteilung:

$$\frac{n^+}{n^-} = e^{-\frac{g \mu_B H_0}{k T}} = e^{-\frac{\Delta E}{k T}} \quad \text{Glg. 8}$$

Außer von der Boltzmann-Konstanten k hängt das Besetzungsverhältnis also auch von der Temperatur T und dem Energieunterschied zwischen den Niveaus ΔE ab. Im thermischen Gleichgewicht ist $n^- > n^+$ und die Absorption proportional zur Besetzungsdifferenz [39,90].

Spin-Hamilton-Operator

Die Energie eines oder mehrerer ungepaarter Elektronen (an einem Atom oder Molekül) in einem bestimmten Magnetfeld B wird allgemein durch den Spin-Hamilton-Operator beschrieben. Er besteht aus fünf Termen und kann schematisch wie folgt dargestellt werden:

$$H = H_{ZE} + H_{FS} + H_{HFS} + H_{KZ} + H_Q \quad \text{Glg. 9}$$

Hierbei sind die einzelnen Komponenten:

H_{ZE}	Elektronen-Zeeman-Term
H_{FS}	Feinstruktur-Term
H_{HFS}	Hyperfeinstruktur-Term
H_{KZ}	Kern-Zeeman-Term
H_Q	Kernquadrupol Term

Da in meinen Untersuchungen nur Moleküle mit einem ungepaarten Elektron auftreten, entfällt der Feinstrukturterm, und der Quadrupolterm ist wegen der verwendeten Art der Spektroskopie nicht sichtbar, so dass zur Beschreibung der gemessenen ESR-Spektren die Betrachtung des Operators mit folgenden Komponenten ausreichend ist [39,90]:

$$H = H_{ZE} + H_{HFS} + H_{KZ} \quad \text{Glg. 10}$$

Nachfolgend sollen nun diese drei Komponenten kurz vorgestellt werden.

Elektronen-Zeeman-Term

Dieser Term beschreibt die Wechselwirkung des Elektrons mit dem äußeren Magnetfeld (siehe Glg. 3). Der Spin S orientiert sich in Abwesenheit innerer Felder an dem äußeren Feld B_0 . In den Experimenten jedoch sind innerhalb der Moleküle innere Felder (von dem Spin benachbarten Gruppen oder Liganden hervorgerufen) vorhanden. Die räumliche Symmetrie der Elektronenverteilung wird durch diese Felder entscheidend verändert. Diese Einflüsse können als zusätzliches Feld B_i beschrieben werden, welches sich mit B zu dem effektiven Feld B_{eff} addiert:

$$B_{\text{eff}} = B + B_i \quad \text{Glg. 11}$$

Die in B_i enthaltenen räumlichen und Symmetrie-Informationen sind experimentell nicht festzustellen. Sie werden mathematisch durch den g -Tensor erfasst, der eine Messgröße darstellt. Es folgt also:

$$H_{ZE} = \mu_e \cdot B_{\text{eff}} \mathbf{g} \cdot S \quad \text{Glg. 12}$$

Hyperfeinstruktur-Term

Der Hyperfeinstruktur-Term beschreibt die Wechselwirkungen des Elektrons mit den Magnetfeldern benachbarter Atomkerne, deren Kernspin $I \neq 0$ ist, und ist unabhängig vom äußeren Magnetfeld. Für die Hyperfeinstruktur sind zwei unterschiedliche Mechanismen verantwortlich. Beide lassen sich durch je einen Term beschreiben.

Der isotrope Mechanismus wird durch den Fermi-Kontakt-Term H_k , der anisotrope durch den Dipol-Dipol-Wechselwirkungs-Term H_{DD} beschrieben, die im Hyperfeintensor \underline{A} zusammengefasst werden:

$$H_{HFS} = H_k + H_{DD} = S \cdot \underline{A} \cdot I \quad \text{Glg. 13}$$

Der Fermi-Kontakt-Term ergibt sich aus der nicht verschwindenden Aufenthaltswahrscheinlichkeit $|\Psi(K)|^2$ des Elektrons im kugelsymmetrischen s -Orbital am Kernort K :

$$H_k = a \cdot S \cdot I \quad \text{Glg. 13.1}$$

Die isotrope Hyperfeinkopplung a wird dabei durch folgende Gleichung

$$a = g_e \cdot \mu_B \cdot g_n \cdot \mu_n \cdot (\Psi(K))^2 S \cdot I \quad \text{Glg. 13.2}$$

beschrieben, wobei g_n und μ_n der Kern-g-Faktor bzw. das Kernmagneton sind. Der anisotrope Mechanismus ergibt sich aus der klassischen Betrachtung zweier Dipole im Abstand r voneinander:

$$H_{DD} = g_e \cdot \mu_B \cdot g_n \cdot \mu_n \cdot \left(\frac{S \cdot I}{r^3} - \frac{3(I \cdot r) \cdot (S \cdot r)}{r^5} \right) \quad \text{Glg. 13.3}$$

Der Term der Hyperfeinstruktur kann also als Summe aus beiden Mechanismen dargestellt werden, wobei A' als Dipol-Tensor bezeichnet wird:

$$H_{HFS} = S \cdot (a \cdot \underline{1} + \underline{A}') \cdot I \quad \text{Glg. 13.4}$$

Der Hyperfein-Tensor lässt Rückschlüsse auf die Spin-Dichte Verteilung zu und liefert hinsichtlich der Interpretation ESR-spektroskopischer Daten wichtige Informationen über die geometrische Anordnung der Kerne innerhalb eines Moleküls [39,90].

Kern-Zeeman-Term

Analog zum Elektronspin tritt auch der Kernspin in Wechselwirkung mit dem äußeren Magnetfeld B_0 . Diese Wechselwirkungen werden durch den Kern-Zeeman-Term charakterisiert:

$$H_{KZ} = -g_N \cdot \mu_N \cdot B_0 \cdot I \quad \text{Glg. 14}$$

Hierdurch wird eine Verschiebung des HF-Niveaus bewirkt, die aber gering ist und sich wegen der gleichsinnigen Energieverschiebung der Niveaus nicht in der hier verwendeten ESR-Technik auswirkt.

Letztlich ergibt sich also für den hier betrachteten Spin-Hamilton-Operator folgende Gleichung:

$$H = \mu_e \cdot B_{\text{eff}} \cdot \underline{g} \cdot S + S \cdot (a \cdot \underline{1} + \underline{A}') \cdot I - g_N \cdot \mu_N \cdot B_0 \cdot I \quad \text{Glg. 14.1}$$

Für die in meiner Arbeit hauptsächlich in Lösungen durchgeführten Messungen ist die Betrachtung der isotropen Mechanismen ausreichend, da sich die anisotropen Komponenten in der ausreichend schnellen Rotationsbewegung der Teilchen zeitlich herausmitteln. Es ergibt sich folgender Operator [39,90]:

$$H = g \cdot \mu_e \cdot B_{\text{eff}} \cdot S + a \cdot S \cdot I - g_N \cdot \mu_N \cdot B_0 \cdot I \quad \text{Glg. 14.2}$$

2.5.2 Relaxationsmechanismen

Relaxationsmechanismen spielen eine wichtige Rolle in der Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie und sollen hier kurz eingeführt werden. Ohne ihre Betrachtung würde der durch die Boltzmann-Verteilung festgelegte Besetzungsunterschied der Energieniveaus durch den Absorptionsprozess in kurzer Zeit aufgehoben. Demnach müssen Relaxationsprozesse das thermische Gleichgewicht wiederherstellen. Unter der Relaxation versteht man die meist strahlungslose Rückkehr von Teilchen aus einem angeregten energetisch höheren Niveau in ein unteres Niveau, den Grundzustand [39,90].

Spin-Gitter-Relaxation

Die durch Absorptionsvorgänge gestörte Boltzmann-Verteilung wird durch thermischen Kontakt mit der Umgebung, dem Gitter, wiederhergestellt. Das Gitter nimmt die hierbei freiwerdende Energie auf. Die benötigte Zeit, um die gestörte Boltzmann-Verteilung bis auf den Wert $1/e$ wiederherzustellen, wird als Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 bezeichnet. Folglich relaxieren innerhalb von T_1 ca. 63% der angeregten Spins [39,90].

Spin-Spin-Relaxation

Paramagnetische, d.h. Spin tragende Nachbarmoleküle sind in der Lage über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ihren Spinzustand zu tauschen. Durch den Austausch des Spinzustandes kommt es nicht zu einer Beeinflussung des Besetzungsverhältnisses der Boltzmann-Verteilung, vielmehr wird die Lebensdauer τ eines Spinzustandes beeinflusst. Die charakteristische Zeit für diese Prozesse wird als Spin-Spin Relaxationszeit T_2 bezeichnet [39,90]. Beide Relaxationsmechanismen sind stark von der Temperatur abhängig, so dass für verschiedene Spinsysteme jeweils unterschiedliche optimale Messtemperaturen notwendig sind. Die hier betrachteten Spinsysteme haben für Messungen bei Raumtemperatur geeignete Relaxationszeiten, so dass gute ESR-Signale bei dieser Temperatur erhalten werden.

2.5.3 Spin-Trapping und Spinproben

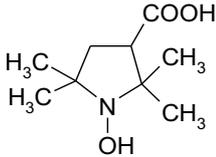
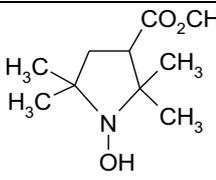
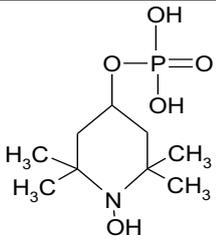
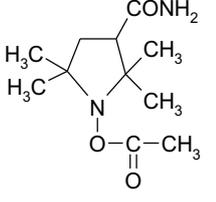
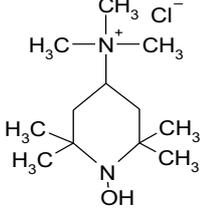
Da die meisten der biologisch relevanten Radikale nur sehr kurzlebig und somit nicht direkt zu detektieren sind, werden Verbindungen benutzt, die mit eben diesen Radikalen stabilere und damit leichter messbare Radikale bilden. Diese Verbindungen bezeichnet man als Spin-Trap oder Spinprobe. Häufig ergeben nach Reaktion mit einem spezifischen Radikal die Spin-

Trap-Radikaladdukte spezifische ESR-Spektren [50]. Ein wichtiger Vorteil des Spin-Trapping liegt deshalb in der Möglichkeit, das ursprüngliche Radikal sowohl zu identifizieren als auch zu quantifizieren. So eignen sich z.B. α -(4-Pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitrone (4-POBN) und N-tert-Butyl- α -phenylnitrone (PBN) gut zum Fangen von Radikalen mit Kohlenstoff Zentrum, wie beispielsweise in Lipidradikalen, wohingegen 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) und 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) hauptsächlich für das Fangen von Superoxid- und Hydroxylradikalen verwendet werden. All diese Spin-Traps haben eine bestimmte chemische Gruppe gemeinsam, die Nitron-Gruppe. Sie ist das N-Oxid eines Imins mit der generellen Struktur $R_1R_2C=NR_3^+O^-$, wobei R_3 kein Wasserstoff ist [26,33]. Theoretisch sollte die Methode des Spin-Trappings also eine elegante Möglichkeit bieten, Radikale in biologischen Systemen zu messen. Dem stehen allerdings zwei große Nachteile der bisher etablierten Traps entgegen. Zum einen sind die gebildeten Radikaladdukte der Traps in biologischen Systemen selbst oft instabil. So entsteht nach einer Ein-Elektronen-Reduktion des Radikals durch Ascorbat, Flavine oder Thiole eine ESR-spektroskopisch nicht mehr detektierbare Verbindung. Zudem können durch eine enzymatische Umwandlung des Traps neue Radikalstrukturen entstehen, deren Hyperfeinstruktur sich von jener des ursprünglichen Radikaladdukts stark unterscheidet. Zum anderen sind die Messungen in biologischen Systemen durch die oft langsame Kinetik der Spin-Traps limitiert und es müssen sehr hohe Konzentrationen (bis ca. 100 mM) eingesetzt werden [27].

Hier setzen die Spinproben an (Tabelle 1). Sie fangen die Radikale nicht ab, sondern werden von ihnen oxidiert und bilden aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften gut detektierbare Radikale, welche häufig noch nach mehreren Stunden stabil sind (Abbildung 4). Die Gruppe der zyklischen Hydroxylamine hat sich als besonders effektiv zur Messung und Quantifizierung von Radikalen in biologischen Systemen und Zellen erwiesen. Ihr Vorteil liegt nicht nur in ihrer großen Stabilität auch über eine längere Zeitspanne hinaus, sondern auch in ihrer sehr schnellen Kinetik. So ist die Reaktionskonstante der Spinprobe CMH etwa 150-fach höher als die des Nitron-Spin-Traps 5-(Ethoxycarbonyl)-5-methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (EMPO) [27]. Sie ermöglicht es, mit den zahlreichen Antioxidantien in Zellproben zu konkurrieren und somit eine genauere Aussage über die Produktionsrate und -menge zu treffen. Diese Hydroxylamin-Verbindungen weisen jedoch den Nachteil auf, dass das resultierende stabile Radikal unabhängig vom Ausgangsradikal immer das gleiche Spektrum, ein typisches NO-Radikal-Spektrum, ergibt. Hierfür ist die für die Reaktion mit dem Radikal verantwortliche Nitroxid-Gruppe der Hydroxylamine verantwortlich.

Um Aussagen zum ursprünglichen Radikal machen zu können, bedarf es bei dieser Methode weiterer Untersuchungen der Proben mit verschiedenen spezifischen Radikal-Scavengern, wie z.B. SOD für das Superoxidradikal [29–32]. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe von zyklischen Hydroxylaminen zur ROS-Messung, die sich in ihrer Reaktionskinetik und ihrem Wirkort unterscheiden. In der folgenden Auflistung sind wichtige Vertreter mit ihren Spezifikationen dargestellt sind:

Tabelle 1: Spinproben und ihre Eigenschaften

Spinprobe	Strukturformel	Charakterisierung
CPH		Partiell zellpermeabel, ungiftig; für Superoxid und Peroxynitrit Messungen in vivo und in vitro
CMH		Zellpermeables Analogon zu CPH mit, im Vergleich, bis zu dreifacher Empfindlichkeit zu Superoxid.
PPH		Nicht zellpermeables Analogon zu CPH, für Superoxidmessungen außerhalb der Zellen
ACP		Spinprobe für Messungen intrazellulärer ROS, durch Ester geschützte Nitroxid-Gruppe
CAT1H		Spinprobe für in vivo Messungen von Superoxid mit hoher Stabilität auch in Blutplasma, eignet sich zur intravenösen und intraperitonealen Infusion

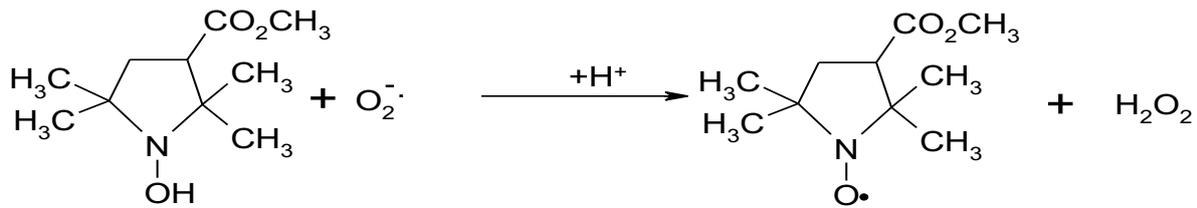


Abbildung 4: Reaktionsschema der Spinprobe CMH mit einem Superoxidradikal.

Die Reaktion der zyklischen Hydroxylamine (hier CMH) mit dem primären Superoxid-Radikal beruht auf der Reduktion des Superoxids zu Wasserstoffperoxid, das seinerseits nicht mehr mit der Ausgangssubstanz CMH reagieren kann. Das in dieser Redoxreaktion gebildete CM-Radikal wird durch die der NO-Gruppe benachbarten Methylgruppen stabilisiert. Im Gegensatz zu den Nitronen bindet das Superoxid nicht an das CMH.

2.6 Fragestellung

Die biologische Relevanz von ROS ist in den vorherigen Kapiteln beschrieben worden. Der erste Schritt in ihrer Entstehung ist stets die Produktion von Superoxidradikalen aus molekularem Sauerstoff. Umso wichtiger ist es, die biologischen und chemischen Vorgänge dieses Schrittes messen und verstehen zu können. Besonders das genaue Messen der Superoxidradikale stellt eine große Herausforderung dar, da sie meist nur in sehr geringen Konzentrationen auftreten. Außerdem sind sie durch ihre hohe Reaktivität nur sehr kurzlebig (10^{-4} s), was den Nachweis des gemessenen Radikals zusätzlich erschwert.

Die Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie bietet die Möglichkeit Radikale direkt zu messen (Kapitel 2.5). Außerdem stellt sie aus physikalischer und chemischer Sicht die bestmögliche Methode dar [28]. Bislang gab es an unserem Institut keine definierten Messprotokolle, um Superoxidradikale, die von lebenden menschlichen Zellen produziert werden, mittels ESR zu detektieren. Das erste Ziel dieser Arbeit war folglich, die in der Literatur bereits beschriebenen Möglichkeiten zur ESR-Messung an lebenden menschlichen Zellen und deren ROS-Produktion zu testen und ein eigenes, auf unsere Anforderungen abgestimmtes Messprotokoll zu definieren. Dieses Protokoll sollte es ermöglichen, klare Aussagen über Reaktionskinetik und Art der gemessenen reaktiven Sauerstoffspezies zu treffen. Außerdem sollte es möglichst standardisiert und einfach zu erlernen sein, um so von mehreren Mitgliedern der Forschungsgruppe und Gästen anderer Institute angewandt werden zu können. Zudem stellte sich die Frage, ob es möglich ist, alleine durch die ESR auf Reaktionswege und Signaltransduktion in der ROS-Produktion schließen zu können. Unsere Arbeitsgruppe interessiert sich besonders für die Physiologie der angeborenen Immunantwort und im speziellen für die Rolle von Kalzium in der Signaltransduktion. Daher wurde untersucht, ob die Rolle von Kalzium in diesen Signalwegen auch mit ESR nachzuvollziehen ist.

Kapitel 3 Materialien und Methoden

3.1. Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Folgend sind alle für die verschiedenen Experimente verwendeten Chemikalien und Reagenzien alphabetisch aufgeführt.

Tabelle 2: Chemikalien und die Bezugsquelle

Chemikalie	Bezug
4 α -PDD, C ₄₀ H ₆₄ O ₈ 4 α -Phorbol 12,13-didekanoat	Sigma-Aldrich, P8014
Argon Gas	Messer Griesheim
BisGö; (Gö 6983), 3-[1-[3-(Dimethylamino)propyl]-5-methoxy-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrol-2,5-dione	Sigma-Aldrich, G1918
CaCl ₂ Kalziumchloridlösung	Fluka Analytica/Sigma, 21115
CMH, C ₁₀ H ₂₀ NO ₃ 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine	Noxygen, NOX-02.1
CPH, C ₉ H ₁₇ NO ₃ 1-Hydroxy-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine	Noxygen, NOX-01.1
Desferoxamin C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈ · CH ₄ O ₃ S	Sigma-Aldrich D9533-1G
DETC, (C ₂ H ₅) ₂ NCSSAg Diethylthiocarbamat	Sigma-Aldrich D93503-5G
DMSO, (CH ₃) ₂ SO Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, D8418
DPI, C ₁₂ H ₈ I · Cl Diphenyleneiodoniumchloride	Sigma-Aldrich, D2926
Ficoll-Paque TM PLUS	Amersham Biosciences 17-1440-03
Glukose	Merck 104933
HEPES Sigma Ultra 50g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma, H7523
Kaliumchloridlösung (KCL)	Merck, 105833

Chemikalie	Bezug
Magnesiumchlorid- Lösung (MgCl ₂)	JT Barker, 0504
PMA, C ₃₆ H ₅₆ O ₈ Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma, P1585
SOD, Superoxid-Dismutase	Sigma, S7511
Stickstoff Gas 5.2	Praxair
Thapsigargin, C ₃₄ H ₅₀ O ₁₂	Invitrogen, T7458
TEMPOL C ₉ H ₁₈ NO ₂ 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl	Sigma, 176741
Xanthin, C ₅ H ₃ N ₄ NaO ₂ 2,6-Dihydroxypurine	Sigma, X4002
XO Xanthine-Oxidase, 1.0-2.0 U/mg protein	Sigma, X4500

3.2 Medien und Lösungen

- Natriumchlorid-Lösung: NaCl 0,9% B. Braun, 3570310; Sigma S9888
- Krebs-Hepes-Puffer: Noxygen, NOX-07.6.1
- Ringer-Lösung: Die für die spektroskopischen Messungen verwendeten Lösungen wurden frisch angesetzt. Sie weisen folgende Konzentrationen auf:
 - 1mM CaCl₂-Ringer-Lösung: 155mM NaCl, 4,5mM KCl, 10mM Glucose, 5mM HEPES, 2mM MgCl₂, 1mM CaCl₂. Der pH wird mit einem pH-Meter kontrolliert und mittels 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
 - 0mM CaCl₂-Ringer-Lösung: 155mM NaCl, 4,5mM KCl, 10mM Glucose, 5mM HEPES, 3mM MgCl₂, 0mM CaCl₂. Der pH wird mit einem pH-Meter kontrolliert und mittels 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
- RPMI-Medium: Das Roswell Park Memorial Institute Medium, Invitrogen 1640. Es wurde mit 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, 15140122) und 10% FCS (fetales Kälberserum, Gibco, 10270098) versetzt.
- PBS (Phosphate Buffered Saline): Invitrogen, 14190-094
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution): PAA Laboratories GmbH H15-009
- Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes System: Invitrogen, 113.50D
- Erythrozytenlysepuffer: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA; pH 7,3
- AIM-V-Medium: Invitrogen, 12055

- Das Xanthin/Xanthinoxidase-System (X/XO), enthielt 1mU/ml Xanthinoxidase und 50µM Xanthin und wurde in einer Natriumphosphat-Pufferlösung (20mM, pH=7,4) gelöst.
- Trypanblau: TrypanBlue Solution 0,4%; Sigma, T-8154

3.3 Software, Geräte und Material

- Win EPR: Bruker
- Origin® (Version 6.1, 8.5)
- Medeia: Eigene Software
- Microsoft Excel

- ESR-Spektrometer der Firma Bruker (ESP300e, X-Band 9,5 GHz)
- Tischzentrifuge: Amicon Bioseparations Microcentrifuge MC-13
- Hettich-Zentrifuge, Modell 32R
- Hettich-Zentrifuge, Modell 30F
- Temperature and Gas Controller Bio III, Model: NOX-E.4-TGC
- Neubauer Zählkammer: Neubauer improved
- Messkapillare: Hirschmann, 50µL
- Critoseal, ESR-inaktives Verschlussmaterial für Messkapillare
- Zellkulturflaschen: Falcon, 353136 und 353028
- Leucosep-Röhrchen: Greiner, 227290

3.4 THP-1 Monozyten

Die THP-1 Monozyten für die ESR-Messungen wurden von dem Labor der Biophysik unter Leitung von Prof. Dr. Markus Hoth bereitgestellt. Kultiviert wurden die Zellen in dem unter Punkt 5.1.2 genannten RPMI-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 10% FCS bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % H₂O.

Das Passagieren der kultivierten Zelllinien erfolgte durch die Mitarbeiter des Labors jeweils montags, mittwochs und freitags. Hierdurch wurden die Zellen immer in einer mittleren Zelldichte von $1 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^6$ pro Milliliter gehalten.

3.5 Zellen gesunder humaner Spender

Vor der letztendlichen negativen Isolation des für das jeweilige Experiment benötigten Zelltyps wurde eine Isolation der peripheren mononukleären Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells PBMCs) durchgeführt. Das menschliche Vollblut stammte aus einem Leukozyten Depletionsfilter (Leucocyte Reduction System Chamber, LRS Kammer). Dieser wurde freundlicherweise von der Abteilung für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

Die Isolation erfolgte bei Raumtemperatur. Folgende Schritte waren notwendig:

1. Lösen der Zellen aus den Filtern: Filter mit HBSS in einer 20ml Spritze entgegen der ursprünglichen Laufrichtung des Blutes spülen und in Leucosep-Röhrchen aufnehmen. Insgesamt waren ca. 60ml HBSS notwendig.
2. Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation der PBMCs: Die Leucosep-Röhrchen wurden mit 16ml Ficoll und HBSS auf ein Gesamtvolumen von 50ml aufgefüllt. Erst folgte eine kurze Zentrifugation von 30s bei 1000g, um das Ficoll auf den Boden des Leucosep-Röhrchens zu bringen. Anschließend folgte, als eigentliche Dichtegradientenzentrifugation, ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 450g. Hiernach wurde der Leukozytenring mit einer Pipette abgenommen und in ein Falconröhrchen (50ml) pipettiert.
3. Weitere Aufreinigung und Erythrozytenlyse: Jetzt wurde das Falconröhrchen erneut mit HBSS auf 50ml aufgefüllt und 15min bei 250g zentrifugiert. Das Pellet wurde erst für eine Minute in 1ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert, dann erneut mit HBSS auf 50ml aufgefüllt und die Lyse somit beendet. Nach einer letzten Zentrifugation (10 min bei 200g) wurde das verbleibende Pellet in 20ml PBS/0,5% BSA aufgenommen und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Nach der Isolation der PBMCs aus dem Blut der LRS Kammer wurden die für die Experimente benötigten Monozyten vor jedem Experiment frisch isoliert. Die mononukleären Zellen wurden bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gehalten.

3.5.1 Die Isolation der CD14⁺ Monozyten

Die CD14⁺ Monozyten wurden mit Hilfe eines speziellen Isolation-Kits (Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes) isoliert nach der Anleitung des Herstellers. Es handelte sich hierbei um eine negative Isolation, um eine vorzeitige Stimulierung der Zellen zu vermeiden.

Das Isolations-Kit enthält magnetische Partikel, sogenannte Dynabeads®. Diese sind mit unterschiedlichen Antikörpern beschichtet. In diesem Kit binden die Antikörper an alle Zelltypen der PBMCs außer den CD14⁺ Monozyten (negative Isolation). Nach erfolgreicher Anwendung des Isolationsprotokolls konnten alle Zellen, außer CD14⁺ Monozyten, mittels eines Magneten entfernt werden, ohne die Monozyten durch Stress zu stimulieren.

Die einzelnen Schritte wurden gemäß der Anleitung durchgeführt. Nachfolgend werden die Hauptschritte kurz zusammengefasst:

1. Hinzufügen eines Hemmstoffs (blocking reagent) gegen Fc-Rezeptoren um einer Aktivierung der Monozyten über CD64 vorzubeugen.
2. Zugabe des Antikörpermixes gegen alle PBMCs abgesehen von CD14⁺ Monozyten
3. Beads vorbereiten und hinzugeben. Diese binden an die Antikörper.
4. Mit Hilfe eines Magneten werden CD14⁺ Monozyten von anderen Zellen getrennt.
5. Die zurückbleibenden Monozyten werden in RPMI-Medium/10%FCS (Kapitel 3.2) überführt und bis zu dem jeweils anschließenden Experiment in einer Dichte von 3×10^6 Zellen/ml unter Standardbedingungen (Kapitel 3.4) gelagert. Ein Vitalitätstest erfolgte mit Trypanblau.

Die Isolation der PBMCs und letztendlich der CD14⁺ Monozyten erfolgten unter Aufsicht von, bzw. durch, Medizinisch-Technische-Assistenten des Labors von Prof. Hoth.

3.6 ESR-Spektroskopie

Die Messungen erfolgten an einem Spektrometer (ESP300e) der Firma Bruker, das mit einem Frequenzzähler (HP 5130A), NMR-Gaussmeter (Bruker), Signal Channel, sowie einem integrierten, die wesentlichen Spektrometereinstellungen steuernden Rechner ausgestattet ist. Die Messproben wurden in dem Standard-Hohlraumresonator (Cavity) 4102ST gemessen.

Sämtliche Messungen an CD14⁺ Monozyten wurden bei konstanten Temperaturen durchgeführt. Die Temperaturen konnten mittels eines kombinierten Gas- und Temperaturcontrollers der Firma Noxygen (Temperature and Gas Controller Bio III, Model: NOX-E.4-TGC) genau eingestellt werden (Abbildung 5).

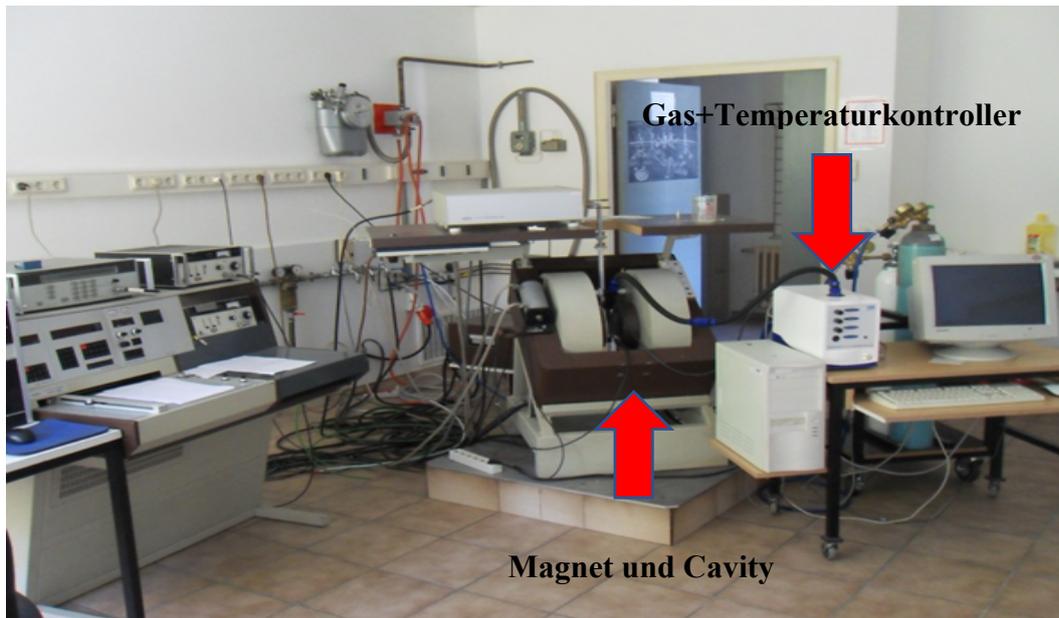


Abbildung 5: Messlabor und Messplatz.

Das Foto zeigt das Messlabor mit dem Spektrometer und dem mit der Cavity verbundenem Gas- und Temperaturkontroller rechts im Bild.

3.6.1 Aufzeichnung der Spektren

Die durch den Mikrowellengenerator (Klystron) erzeugte hochfrequente elektromagnetische Strahlung von ca. 9,5 GHz gelangt über ein innen mit Silber beschichtetes und vergoldetes Hohlleitersystem und einen Zirkulator in die Cavity. Diese befindet sich zwischen den beiden Polen eines Elektromagneten. Anders als viele spektroskopische Methoden misst das ESR-Spektrometer nicht die Intensität an Strahlung, die von der Messprobe durchgelassen wird, sondern die Veränderungen der Strahlungsintensität, die von der Cavity mit der Messprobe im Falle der Absorption reflektiert werden. Die physikalischen Grundlagen dieser Veränderungen wurden in Kapitel 2.5 besprochen. Diese reflektierte Strahlung gelangt wieder zu dem Zirkulator, welcher dafür sorgt, dass nur die reflektierte Strahlung zum Detektor (Mikrowellendiode) weitergeleitet wird (Abbildung 6). Die Frequenz der Mikrowellenstrahlung wird hierbei konstant gehalten und kontinuierlich abgestrahlt (daher continuous wave spectroscopy). Helmholtz-Spulen auf beiden Seiten der Cavity modulieren das linear hochfahrende äußere Magnetfeld mit einem Wechselfeld der Frequenz 100 kHz. Durch die Modulation wird das Diodensignal phasen- und frequenzselektiv im Lock-in verstärkt, wodurch letztendlich die 1. Ableitung der Absorption detektiert wird (Abbildung 7). Die Signalintensität ist dabei strikt proportional zur Konzentration der gemessenen Spins. Das verstärkte Signal wird digitalisiert aufgezeichnet, auf einem Computer dargestellt und anschließend mit den zugehörigen Parametern gespeichert.

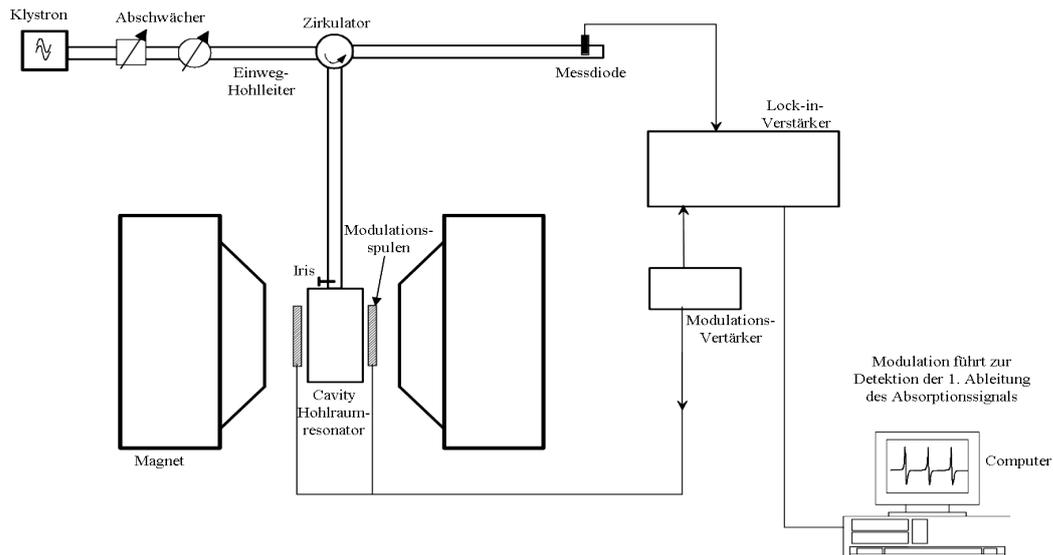


Abbildung 6: Prinzipieller Aufbau eines ESR-Spektrometers.

Das Blockschaltbild zeigt vereinfacht den Aufbau eines ESR-Spektrometers und die Detektion des Signals mittels üblicher 100kHz Magnetfeldmodulation. Das Bild wurde von Dr. R. Kappl zur Verfügung gestellt.

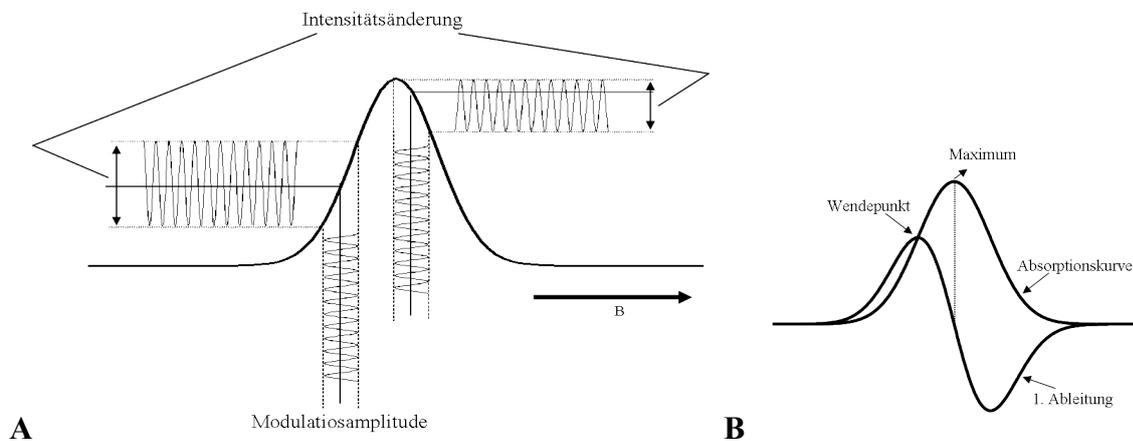


Abbildung 7: Magnetfeldmodulation des ESR-Signals.

A Durch Modulation mit bekannter Frequenz (100kHz) und Phasenlage wird die erste Ableitung der Absorptionskurve B detektiert. Die Abbildung wurde von Dr. R. Kappl zur Verfügung gestellt.

Die Cavity

Die Cavity beinhaltet während der Messung die Probe. Ihre Aufgabe ist es, am Ort der Probe eine hohe Dichte der magnetischen Komponente der Mikrowellenstrahlung zu erzeugen. Dies wird dadurch erreicht, dass die Frequenz der Mikrowelle auf die durch die Geometrie der Cavity vorgegebene Eigenfrequenz genau abgestimmt wird. Die Ankopplung der Cavity an das Hohlleitersystem erfolgt über eine so genannte Irisschraube, so dass bei optimaler Ankopplung keine Reflexion der Mikrowelle erfolgt. Die eingestrahelte Leistung verbleibt in

der Cavity und kann von der Probe absorbiert werden. Im Falle der Absorption wird die Abstimmung der Cavity gestört und ein entsprechender Anteil der Mikrowellenstrahlung reflektiert und von der Diode detektiert.

Die Messparameter:

In einer Reihe von Vorversuchen sind die optimalen Parameter zur Aufnahme der ESR-Spektren von Nitroxidradikalen festgelegt worden. So muss die Amplitude der Magnetfeldmodulation (MA) bei 100 kHz Modulationsfrequenz so eingestellt werden, dass das Signal mit optimaler Intensität jedoch ohne Verbreiterung durch die Modulation aufgezeichnet wird. Wichtig ist zudem, die Mikrowellenleistung (MWL) so anzupassen, dass das Signal nicht durch Sättigungseffekte (Relaxation) verringert und verbreitert wird. Für den Sweep über den vorgegebenen Magnetfeldbereich werden die Messzeit pro Spektrum (Conversion Time, CT) und eine optimale Filterkonstante (Time Constant, TC) eingestellt. Durch die Anwendung der folgenden Standardparameter ist gewährleistet, dass die Spektren in hohem Maß reproduzierbar und damit über verschiedene Messungen vergleichbar sind:

MA: 1 Gauss = 0,1 mT; MWL: 20 mW (10 dB); CT: 60 ms (= 1min pro Spektrum); TC: 20 ms; Receiver Gain (Verstärkung): 60 dB.

Alle ESR Spektren sind mit diesen Standardparametern aufgenommen worden.

3.6.2 Auswertung der Spektren

Bei den während dieser Arbeit aufgezeichneten Spektren handelt es sich ausschließlich um die radikalischen Spezies der zyklischen Hydroxylamine CPH und CMH (CP- und CM-Radikal, CP* und CM*). Beide haben das typische Spektrum eines Nitroxidradikals (Abbildung 8). Nachdem die einzelnen Spektren der verschiedenen Messreihen auf einer Festplatte gespeichert wurden, folgte die Auswertung mit spezifischer Software. Pro Minute des jeweiligen Experiments wurde jeweils ein Spektrum aufgezeichnet. Die Signalintensität jedes Spektrums wurde durch die „peak-to-peak“ Methode ermittelt. Dies musste anfangs per Hand erfolgen. Die Spektren wurden dazu in das Programm WinEPR von Bruker eingelesen, das Maximum und Minimum bestimmt und die Beträge addiert. Im Verlauf meiner Arbeit wurde durch Gerhard Bracic ein für unsere Arbeit abgestimmtes Programm geschrieben (Medeia), welches die Auswertung der Spektren nach der „peak-to-peak“ Methode automatisch vornimmt und die einzelnen Werte nach dem Zeitpunkt ihrer Messung ordnet. Außerdem wurden die jeweiligen Ergebnisse vor der graphischen Darstellung auf 10^6 Zellen normiert.

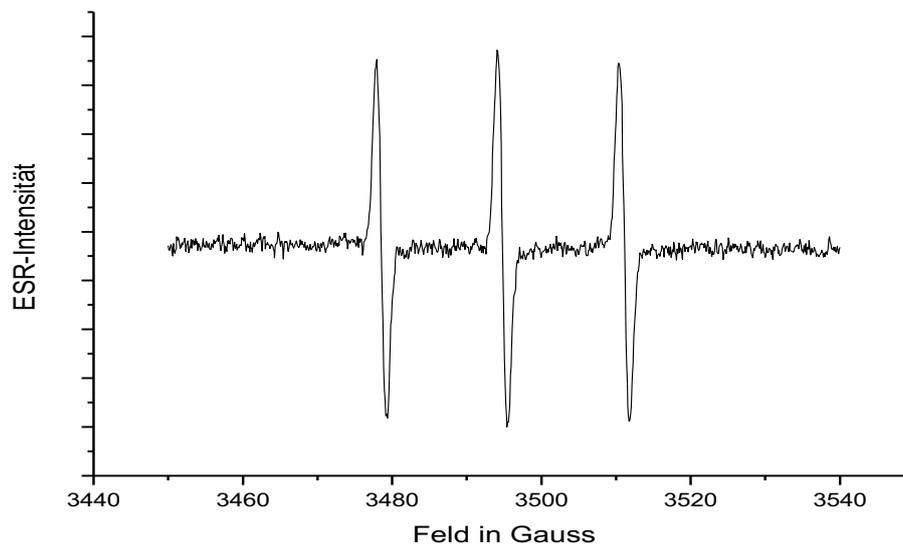


Abbildung 8: Typisches Nitroxid-Radikal Spektrum von CMH und CPH.
Die Signalintensität einer ausgewählten Linie entspricht der Summe der Beträge aus Maximum und Minimum.

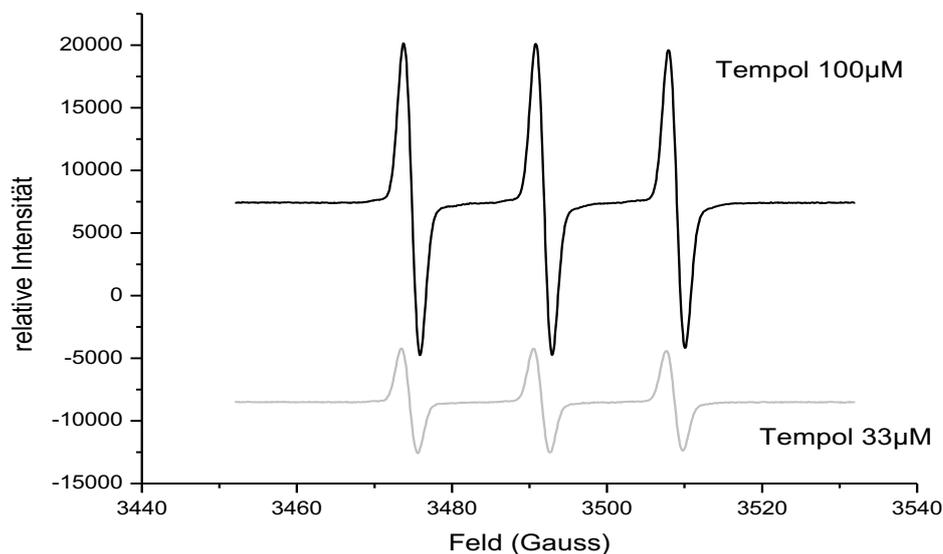


Abbildung 9: Das typische Signal des stabilen Tempolradikals.
Die Signalintensität ist proportional zur Konzentration von Tempol. Es eignet sich hervorragend als Referenzwert beziehungsweise Konzentrationsstandard zur Umrechnung gemessener Signalintensitäten in molare Konzentrationen.

Kalibration zur Bestimmung der Konzentration an ROS

Die Intensität des gemessenen Spektrums gibt die Menge an CM- bzw. CP-Radikalen in der Messprobe an. Die Umrechnung der Signalintensität in molare Konzentrationen erfolgte an Hand von Messungen einer 0,1mM TEMPOL Standardlösung (Abbildung 9).

TEMPOL, ein stabiles Nitroxid-Radikal, wurde in hochreinem Millipore-Wasser in einer Konzentration von 1mM gelöst. Vor jeder Messung wurden mehrere Referenzsignale der auf 0,1mM verdünnten TEMPOL Standardlösung gemessen. Der Mittelwert dieser Signalintensitäten entspricht der Spinkonzentration der Tempollösung von 0,1mM und wurde als Referenz verwertet.

3.7 Allgemeiner Versuchsaufbau

3.7.1 Die Reagenzien

Allen Messpuffern wurde Desferoxamin (DF) und Diethylthiocarbamat (DETC) in der Endkonzentration von 25 μ M bzw. 5 μ M beigelegt. Sie bilden Komplexe mit Metallkationen und sollen ungewollte Nebenreaktionen zur Oxidation der Spinproben verhindern. Vor den Experimenten sind alle benötigten Reagenzien wie folgt vorbereitet und bei -20°C gelagert:

- PMA: Der Phorbolster zur Stimulation der Proteinkinase C wurde in DMSO gelöst und auf mehrere 10mM Aliquots zu je 10 μ l verteilt. Die Endkonzentration während der Messung betrug 1 μ M.
- 4 α -PDD: Der nicht aktive Phorbolster und Stereoisomer von PMA wurde analog zu PMA gelöst und vorbereitet, letztendlich war die Endkonzentration während der Messung 1 μ M.
- Thapsigargin (Tg): Der Hemmstoff der SERCA-Pumpe wurde in DMSO gelöst. Die Basiskonzentration betrug 100 μ M, die Endkonzentration während des Versuchs 2 μ M.
- DPI: Der Hemmstoff der NADPH-Oxidase wurde in DMSO gelöst. Die Konzentration betrug 500 μ M, die Endkonzentration in der Messlösung 10 μ M
- BisGö (Gö 6976): Der Hemmstoff der Proteinkinase C wurde in DMSO gelöst. Die Basislösung war 12,5 μ M, die Endkonzentration während des Experiments 0,5 μ M
- SOD: Die Superoxiddismutase zur Umwandlung des produzierten Superoxids in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff wurde frisch als 2000U/ml Lösung angesetzt. Die Endkonzentration bei der Messung war 100U/ml.
- CMH und CPH: Beide Spinproben wurden jeweils frisch als 10mM Stocklösung angesetzt. Gelöst wurden die Substanzen in mit Argon begaster Natriumchloridlösung. Die Endkonzentration in der Messkapillare betrug jeweils 300 μ M.

3.7.2 Allgemeiner Versuchsablauf

Vor allen Experimenten und Messungen stand das Hochfahren und Kalibrieren des Spektrometers. Sobald das Spektrometer (insbesondere das Klystron) nach einigen Minuten Betriebstemperatur- und der Gas- und Temperaturcontroller die voreingestellte Temperatur von 37 Grad Celsius im Probenraum erreicht hatten, erfolgte die Spektrometeroptimierung ebenso wie das Messen des Referenzsignals der Tempollösung (Kapitel 3.6.2). Vor jedem Experiment mussten frische Spinprobe Stocklösungen angesetzt werden. Hierfür wurde jeweils eine 10mM Lösung von CMH beziehungsweise CPH hergestellt, indem die jeweilige Spinprobe in mit Argon begaster Natriumchloridlösung gelöst wurde (Kapitel 3.7.1).

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.4 dargestellt, aus dem Labor von Prof. Dr. Markus Hoth zur Verfügung gestellt, beziehungsweise wie in Kapitel 3.5 beschrieben, isoliert und vorbereitet. Vor jedem Experiment wurden die Zellen vorsichtig in ihrer Suspension mit einer Pipette gemischt und ihre aktuelle Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Ausgezählt wurden die Monozyten in einer Neubauer-Zählkammer. Bis zu den jeweiligen Experimenten wurden die Zellen immer bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Für die einzelnen Messungen wurden je nach Experiment 500000 oder 1000000 Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und vorsichtig zentrifugiert (7500 rpm für 3 mal 5 Minuten). Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in dem späteren Messpuffer resuspendiert.

Das Volumen der Ringer-Lösungen variierte je nach Experiment (siehe Tabellen Kapitel 3.8), da für die Versuche stets ein Endvolumen von 50µl (Zellsuspension plus Reagenzien) hergestellt wurde. Nach dem Resuspendieren ruhten die Monozyten 10 Minuten, um den Stress durch das Zentrifugieren der Zellen als möglichen Störfaktor zu reduzieren.

Im Anschluss an die Ruhephase wurden die, je nach Messreihe benötigten, weiteren Substanzen in der passenden Dosierung hinzu pipettiert. (Kapitel 3.7.1 und 3.8).

Eine Besonderheit bestand bei Messungen mit BisGö (Gö6976). Hier wurde nach Gabe des Proteinkinase C Hemmstoffes zehn Minuten Inkubationszeit abgewartet, bis die weiteren Reagenzien beigemischt und die Messungen gestartet wurden.

Als letzter Schritt wurde immer die Spinprobe CMH oder CPH in der Endkonzentration von 300µM zugegeben. Danach wurde die Messlösung umgehend in eine Messkapillare aus Glas (Hirschmann, 50µL) eingesaugt, dann mit einer Dichtmasse (Critoseal) verschlossen und sofort in den Kapillarhalter der Cavity eingeführt. Hier wurde für meist zwanzig Minuten jeweils ein Spektrum pro Minute aufgezeichnet. Die Auswertung der Spektren erfolgte wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben.

3.8 Messreihen und Zielgrößen

3.8.1 Experimente ohne Zellen

Experimente zum Vergleich der Spinproben:

Für die Superoxidmessung an Zellen wurden die beiden Spinproben CMH und CPH mit Hilfe des Xanthin-/Xanthinoxidase-Systems (X/XO) verglichen. Das X/XO System erzeugt einen konstanten Fluss an Superoxidradikalen, sodass die Reaktionskinetik mit den Spinproben erfasst und verglichen werden kann.

Die jeweilige Spinprobe wurde in der Endkonzentration von 300 μ M zur X/XO-Lösung hinzugegeben. Von dieser Messprobe von 100 μ l wurde anschließend 50 μ l in einer Glaskapillare in der Cavity fixiert. Es folgte die Messung der Superoxidproduktion zum Vergleich der beiden Spinproben.

Tabelle 3: Pipettierschema: Vergleich CMH und CPH

	Xanthin [μ l]	Xanthinoxidase [μ l]	CPH [μ l]	CMH [μ l]
Messung 1	48,5	48,5	3	
Messung 2	48,5	48,5		3

Experimente zum Vergleich verschiedener Messlösungen:

Verglichen wurden die sterile NaCl-Lösung, der in der Literatur am häufigsten verwendete Krebs-Hepes-Puffer und die im eigenen Labor hergestellte Ringer-Lösung. Diese Lösungen wurden jeweils mit so viel CMH Lösung versetzt, dass ein Endvolumen von 50 μ l und eine CMH-Endkonzentration von 300 μ M vorlag. Diese Probe wurde in die Messkapillare aufgenommen, die an einer Seite verschlossen und in die Cavity zur Messung überführt wurde. Zielgröße der Messung war die Bestimmung der Hintergrund-Signalintensität der verschiedenen Lösungen als Maß für die spontane Oxidation der Spinproben in den einzelnen Messpuffern.

Tabelle 4: Pipettierschema: Vergleich verschiedener Pufferlösungen

	NaCl [μ l]	Krebs-HEPES [μ l]	Ringer-Lösung 1mM Ca ²⁺ [μ l]	CMH Stocklösung [μ l]
Messung 1	48,5	-	-	1,5
Messung 2	-	48,5	-	1,5
Messung 3	-	-	48,5	1,5

3.8.2 Experimente mit THP-1 Zellen

Die Vorbereitungen verliefen wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Ziel war es, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies der THP-1 Monozyten

- nach Zugaben von PMA: Messung 1,
- der Zellen alleine in der Messlösung als Basiswert: Messung 2,
- nach Zugabe von PMA und SOD zum Nachweis von Superoxid als produziertes Radikal: Messung 3,
- und nach alleiniger Gabe von SOD: Messung 4

zu messen und vergleichen.

Tabelle 5: Pipettierschema: Experimente mit THP-1 Monozyten

	Ringer-Lösung 1mM Ca ²⁺ [μ l]	PMA Stock [μ l]	SOD Stock [μ l]	CMH Stock [μ l]
Messung 1	47,5	1	-	1,5
Messung 2	48,5	-	-	1,5
Messung 3	45	1	2,5	1,5
Messung 4	46	-	2,5	1,5

3.8.3 Experimente mit humanen CD14⁺ Monozyten

Am Anfang eines jeden Messtages mit humanen Zellen standen die in Kapitel 3.5 und 3.5.1 erwähnten Vorbereitungen der Monozyten. Für die Experimente wurden immer Monozyten von mehreren gesunden Spendern ($n \geq 3$) untersucht. Die Endkonzentrationen aller Substanzen sind in Kapitel 3.7 beschrieben. Das jeweilige Volumen in der Messlösung geht aus den angegebenen Tabellen und Pipettierschemata hervor.

Folgende Zielgrößen sollten mit den Messreihen bestimmt werden:

- Messung 1: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Stimulation mit PMA
- Messung 2: Die Basisproduktion der unstimulierten Monozyten
- Messung 3: Der Nachweis von Superoxid als produziertes Radikal durch Zugabe von SOD
- Messung 4: Die Superoxidproduktion nach Zugabe von PMA und Hemmung der NADPH-Oxidase durch DPI
- Messung 5: Die Produktion von Superoxid nach Stimulation mittels PMA und gleichzeitiger Hemmung der Proteinkinase C durch BisGö

- Messung 6: Die Superoxidproduktion nach Zugabe von 4a-PDD
- Messung 7: Die Superoxidproduktion nach Gabe von PMA in kalziumfreier Ringerlösung
- Messung 8: Die Produktion von Superoxid nach Zugabe von Thapsigargin
- Messung 9: Die Superoxidproduktion nach Gabe von Thapsigargin und Hemmung der NADPH Oxidase durch DPI
- Messung 10: Die Superoxidproduktion nach Stimulation mittels Thapsigargin und gleichzeitiger Hemmung der Proteinkinase C durch BisGö
- Messung 11: Die Superoxidproduktion nach Gabe von Thapsigargin in kalziumfreier Ringerlösung

Folgende Tabellen geben die Pipettierschemata passend zu den in Kapitel 4.4 und 4.5 dargestellten Versuchsergebnissen wieder:

Tabelle 6: Pipettierschema, CD14⁺ Monozyten in 1mM Ca²⁺ Lösung

	Ringer-Lösung 1mM Ca ²⁺ [μ l]	PMA [μ l]	SOD [μ l]	CMH [μ l]	DPI [μ l]
Messung 1	47,5	1	-	1,5	
Messung 2	48,5	-	-	1,5	
Messung 3	45	1	2,5	1,5	
Messung 4	46,5	1		1,5	1

Tabelle 7: Pipettierschema, CD14⁺ Monozyten in 1mM Ca²⁺ Lösung + BisGö und 4a-PDD

	Ringer-Lösung 1mM Ca ²⁺ [μ l]	PMA [μ l]	CMH [μ l]	Bis/Gö [μ l]	4a-PDD
Messung 1	47,5	1	1,5	-	-
Messung 2	48,5	-	1,5	-	-
Messung 5	45,5	1	1,5	1/1	-
Messung 6	47,5	-	1,5	-	1

Tabelle 8: Pipettierschema, CD14⁺ Monozyten in 1mM -und 0mM Ca²⁺ Lösung

	Ringer-Lösung 1mM Ca ²⁺ [μ l]	PMA [μ l]	SOD [μ l]	CMH [μ l]	DPI [μ l]	Ringer 0M Ca ²⁺
Messung 1	47,5	1	-	1,5	-	-
Messung 2	48,5	-	-	1,5	-	-
Messung 3	45	1	2,5	1,5	-	-
Messung 4	46,5	1	-	1,5	1	-
Messung 7	-	1	-	1,5	-	47,5

Tabelle 9: Pipettierschema, CD14⁺ Monozyten in 1mM Ca²⁺ Lösung nach Tg-Zugabe

	Ringer-Lösung 1mM Ca ²⁺ [μ l]	Tg[μ l]	CMH [μ l]	DPI [μ l]	Ringer 0M Ca ²⁺	Bis/Gö [μ l]
Messung 8	47,5	1	1,5	-	-	-
Messung 2	48,5	-	1,5	-	-	-
Messung 9	46,5	1	1,5	1	-	-
Messung 11	-	1	1,5	-	47,5	-
Messung 10	45,5	1	1,5	-	-	1/1

3.9 Auswertung und Statistik

Die Auswertung und das Umrechnen der Spektren wurden wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben durchgeführt. Im Ergebnisteil sind die Daten, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler über die Zeit aufgetragen. Dazu wurden die Messreihen (siehe Kapitel 3.8 und Pipettierschemata) mehrfach für verschiedene Spender wiederholt und aus den gemessenen Signalintensitäten bzw. Superoxidkonzentrationen des jeweiligen Messzeitpunkts Mittelwerte gebildet sowie Standardabweichung und der jeweilige Standardfehler (SE) berechnet, der als Fehlerbalken angegeben wurde (mit Origin® Version 6.1 und 8.5). Die initialen Produktionsraten an Superoxid der Bildungskurven wurden mit der Methode des linearen Fits bestimmt. Hier entspricht die Steigung des jeweiligen Fits der Bildungsrate (meist in μ M/min). Zusätzlich sind die Standardfehler der linearen Fits angegeben. Der R² Wert war für alle linearen Fits größer als 0.998.

Kapitel 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte die Messbarkeit reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an Zellen des Immunsystems in Echtzeit untersucht werden. Die direkte Messung der primären Produkte bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, den Superoxidradikalen, ist eine große Herausforderung. Diese liegt vor allem darin, dass die zu messenden Radikale häufig nur in geringen Konzentrationen auftreten und sehr kurzlebig sind (10^{-4} s). Oft werden diese ROS indirekt über die Messung von Wasserstoffperoxid gemessen, das durch spontane Dismutation von Superoxid oder durch Konversion von Superoxid durch die SOD gebildet wird. Dank der Elektronen Spin Resonanz Spektroskopie kann die direkte Messung von Superoxid über eine geeignete Spinprobe, die das Radikal stabilisiert, erfolgen. Folgende Ziele hat die hier vorliegende Arbeit (siehe auch Kapitel 2.6):

- Erarbeitung eines definierten Protokolls für die direkte Detektion Sauerstoffradikale, welches gut reproduzierbare Ergebnisse liefert und einfach zu erlernen ist.
- Die Quantifizierung und Identifikation der gemessenen reaktiven Sauerstoffspezies.
- Ein besseres Verständnis für die Physiologie der ROS-Produktion vor allem in der angeborenen Immunantwort, vor allem hinsichtlich der Rolle von Kalzium.

4.1 Die Spinprobe

Als erstes wurde die geeignete Spinprobe bestimmt. Es sollte zunächst keine Differenzierung von intra- und extrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies erfolgen. Deswegen wurden die beiden gebräuchlichsten Substanzen CMH und CPH unter identischen Bedingungen verglichen. Nach Zugabe gleicher Mengen an Xanthin und Xanthinoxidase wurde ihre Empfindlichkeit gegenüber dem gebildeten Superoxid getestet. CMH als Analogon zu CPH sollte hierbei deutlich empfindlicher gegenüber diesen Radikalen sein [29,30].

In Abbildung 10 sind die gemessenen Signalintensitäten der beiden genannten Spinproben über 80 Minuten im Reaktionssystem X/XO dargestellt. Es zeigt sich, dass unter gleichen Bedingungen die Spinprobe CMH, in den ersten 10 Minuten, einen deutlich steileren initialen Signalanstieg (Faktor 2,64) aufweist. Nach 80 Minuten ist außerdem eine wesentlich höhere Signalintensität von 2400 gegenüber 1200 Intensitätseinheiten für CMH gegenüber CPH erreicht. Wegen der höheren anfänglichen Signalausbeute wurde in den folgenden Versuchen die Spinprobe CMH verwendet.

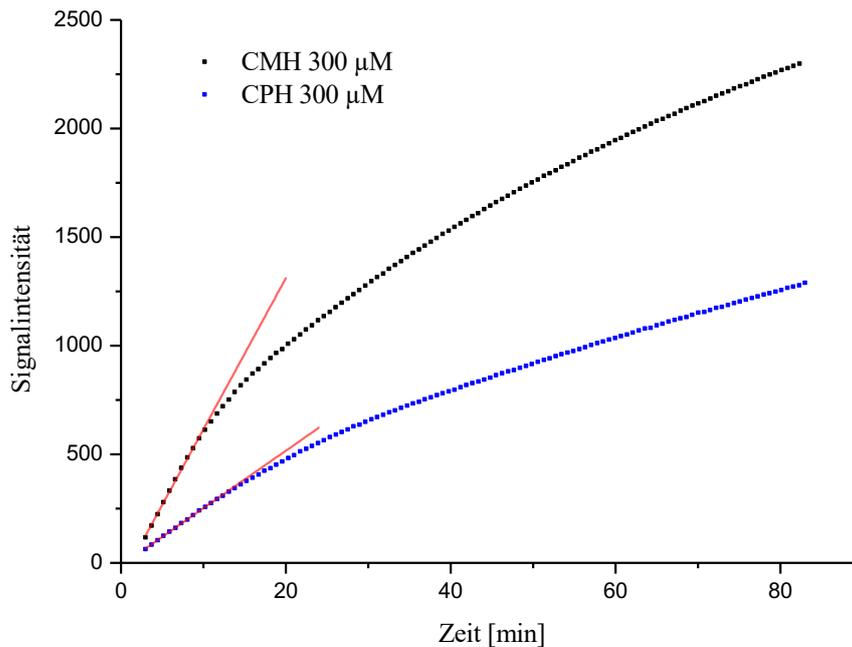


Abbildung 10: Vergleich der Spinproben CMH (schwarz) und CPH (blau) bei 22°C bei Superoxidproduktion durch das X/XO-System.

Messungen erfolgten im Phosphat-Puffer ohne Chelatoren DF, DETC. Die initialen Steigungen betragen $26,4 \pm 0,2$ AU/min für CPH und $69,7 \pm 1,1$ AU/min für CMH und sind durch linearen Fit (rote Geraden) über die ersten 10 min bestimmt worden.

4.2 Die Messlösung und Messbedingungen

Es galt zunächst einen geeigneten Versuchsaufbau zu finden. Deshalb erfolgten als Erstes Versuche zu verschiedenen Messlösungen, Spinproben und den Lagerungstemperaturen der Spinproben. Zu Beginn sollte eine – für Zellen geeignete – Messlösung gefunden werden, welche ein möglichst geringes Hintergrundsignal hat und auch während des Lagerns bei Zimmertemperatur über die Versuchsdauer hinweg ohne nennenswerte Steigerung des Hintergrundsignals bleibt. Abbildung 11 zeigt einen repräsentativen Vergleich der drei Messlösungen NaCl 0,9%, Ringerlösung und Krebs-Hepes Pufferlösung. Es wurde die Eigensignalintensität ohne Intervention und nach Zugabe der Spinprobe CMH gemessen. Diese Signalintensität entspricht dem Hintergrundsignal durch spontane Oxidation der Spinprobe. Es ist zu erkennen, dass die physiologische Kochsalzlösung (schwarze Kurve) und die Ringerlösung (rote Kurve) im Zeitverlauf über 60 Minuten keine relevante Signalintensität entwickeln. Im Gegensatz dazu hatte die Krebs-Hepes Pufferlösung (grüne Kurve) eine sehr hohe Signalintensität mit linearem Anstieg, welche nach 55 min bei über 17000 Intensitätseinheiten lag.

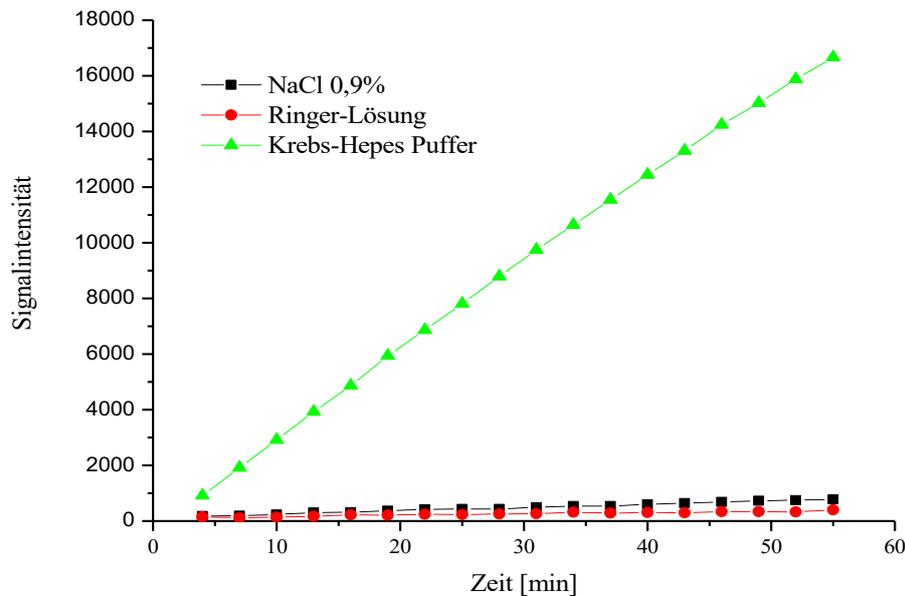


Abbildung 11: Eigensignal der Messlösungen mit CMH bei 22°C.

Gezeigt sind Einzelmessungen von NaCl 0,9% (schwarz) Ringerlösung mit 1mM Ca^{2+} -Konzentration (rot) und Krebs-Hepes-Puffer (grün). Die Puffer wurden mit DF und DETC versetzt.

Während dieser Arbeit wurde ein zusätzliches Gerät erworben, welches es möglich machte, Temperatur und Gaspartialdruck während der ESR-Messungen konstant zu halten. Dank des Gas-Flow-Geräts ließ sich nun die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unter physiologischen Temperaturen bei konstanten 37°C untersuchen. Es war zu erwarten, dass nicht nur die jeweilige Messlösung selbst ein störendes Hintergrundsignal liefert, sondern auch die Temperatur während der Messung eine Rolle spielt. Entsprechend wurden die Ringerlösung mit 1mM Ca^{2+} -Konzentration, die 0,9% NaCl Lösung und der Krebs Hepes Puffer auf ihre Eigensignalintensität ohne weitere Intervention bei jeweils 22°C und 37°C verglichen.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse dieses Vergleiches. Die NaCl-Lösung (Abbildung 12A) sowie die Ringerlösung (Abbildung 12B) zeigen eine vergleichbare Zunahme der Signalintensität während der Messdauer von 55 Minuten. Zum Ende der Messung waren die gemessenen Signalintensitäten bei 37°C (jeweils rote Kurve) um das Vierfache (NaCl 0,9%) beziehungsweise um das Sechsfache (Ringerlösung) höher als jene bei 22°C (jeweils schwarze Kurve) gemessenen Intensitäten. Diesen Ergebnissen steht das deutlich abweichende Resultat der Messung der Krebs-Hepes-Pufferlösung gegenüber. Schon bei 22°C erreicht diese Pufferlösung bereits nach 20 Minuten Signalintensitäten von über 5000 Einheiten (Abbildung 12C). Diese Werte sind doppelt so hoch, wie die der beiden anderen

Lösungen bei 37°C nach 55 Minuten. Zum Endzeitpunkt der Messungen nach 55 Minuten zeigt sich ein weiterer deutlicher Anstieg der Signalintensität bis weit über 40000 Intensitätseinheiten bei 37°C und über 15000 Einheiten bei 22°C. Beide Werte liegen zwanzigfach über denen der anderen beiden Messlösungen.

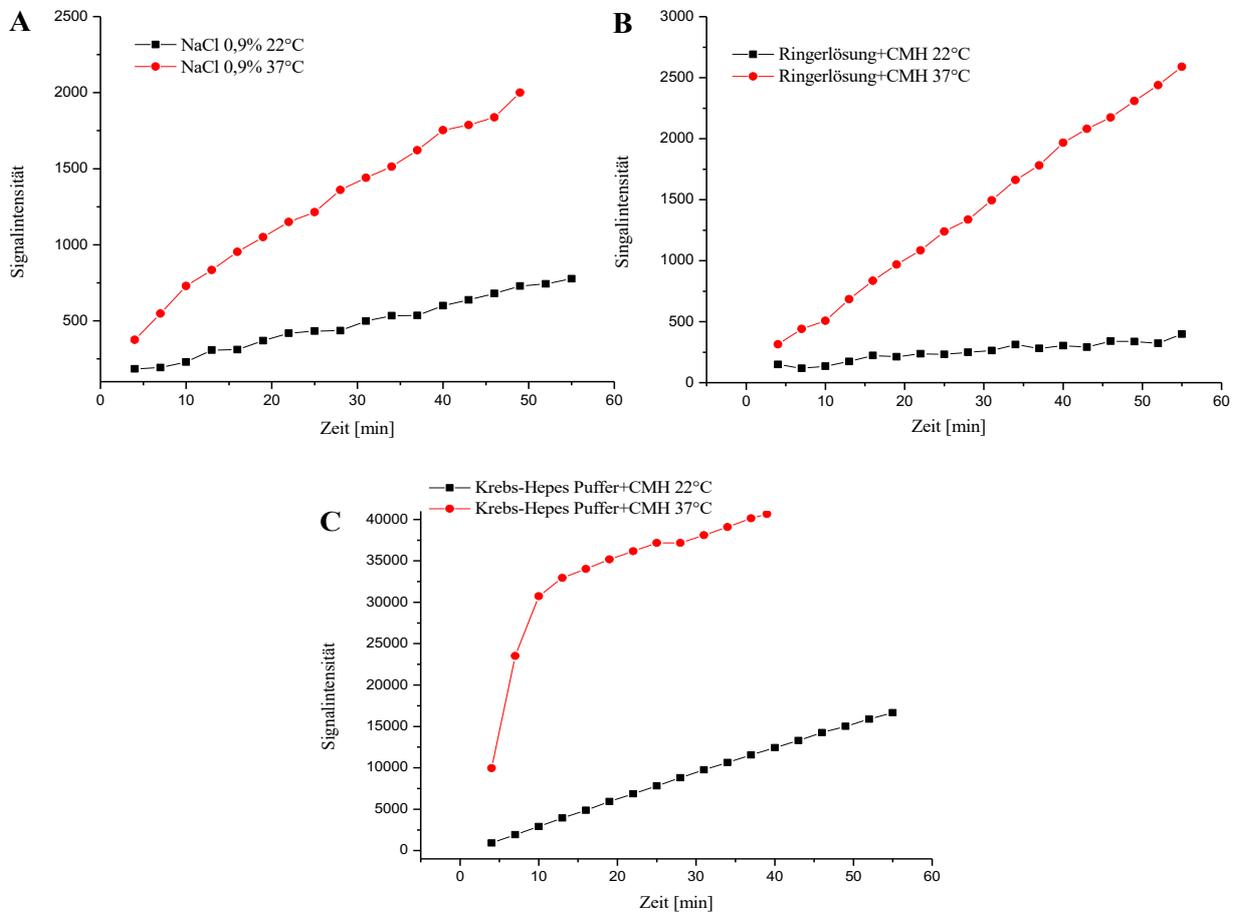


Abbildung 12: Vergleich der Hintergrundsignale der Messlösungen bei 22°C (schwarz) und 37°C (rot).

A NaCl-Lösung, **B** Ringerlösung und **C** Krebs-Hepes-Puffer.

Für die genaue Quantifizierung der Sauerstoffradikale ist es wichtig, dass die verwendete Spinprobe während des Versuches möglichst nur die Superoxidradikale messbar macht, die von den Zellen auch produziert werden. Hierdurch soll eine Verzerrung der Versuchsergebnisse durch etwaige Eigen- oder Hintergrundsignale so gut wie möglich ausgeschlossen bzw. eine Korrektur der Messdaten ermöglicht werden. Außerdem ist für die Messung mit lebenden Zellen eine möglichst physiologische Zusammensetzung der Messlösung anzustreben. Die Ringerlösung konnte diese Voraussetzungen am besten erfüllen, sodass alle weiteren Messungen mit dieser Messlösung durchgeführt wurden und nur die Kalziumkonzentration variiert wurde.

Um festzustellen, ob es außerdem über die Dauer der Messungen des jeweiligen Versuchstags zu einem relevanten Anstieg des Eigensignals der Stocklösung der Spinprobe CMH in 0,9% NaCl kommt, wurde die Signalintensität der Stocklösung nach Zugabe in den Messpuffer (Ringerpuffer) zu verschiedenen Zeiten gemessen. Abbildung 13 zeigt Messungen der Signalintensität für eine vor jeder Messung bei 37°C gelagerte CMH-Lösung über die Zeit (180 Minuten) im Vergleich zu einer bei 0°C gelagerten CMH-Lösung nach Zugabe in die Messlösung Ringerpuffer.

Hierfür wurde die CMH-Stocklösung nach Standard angesetzt, danach wurde eine Hälfte bei 37°C und die andere Hälfte bei 0°C gelagert. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurde jeweils 300µM CMH aus diesen Hälften entnommen, in 50µl Ringerlösung pipettiert und bei 22°C Messtemperatur jeweils ein Spektrum aufgezeichnet.

Die bei 0°C gelagerte CMH-Lösung zeigt im Rahmen unserer Versuchsdauer eine geringe Zunahme der Signalintensität (blaue Kurve). Die bei 37°C gelagerte CMH-Lösung jedoch steigt schon nach 120 Minuten auf eine zwölfmal höhere Signalintensität an (rote Kurve). Für die kommenden Versuche wurde also die Spinprobe CMH jeweils frisch angesetzt und über die Dauer der jeweiligen Messreihe (< 120min) bei 0°C gelagert.

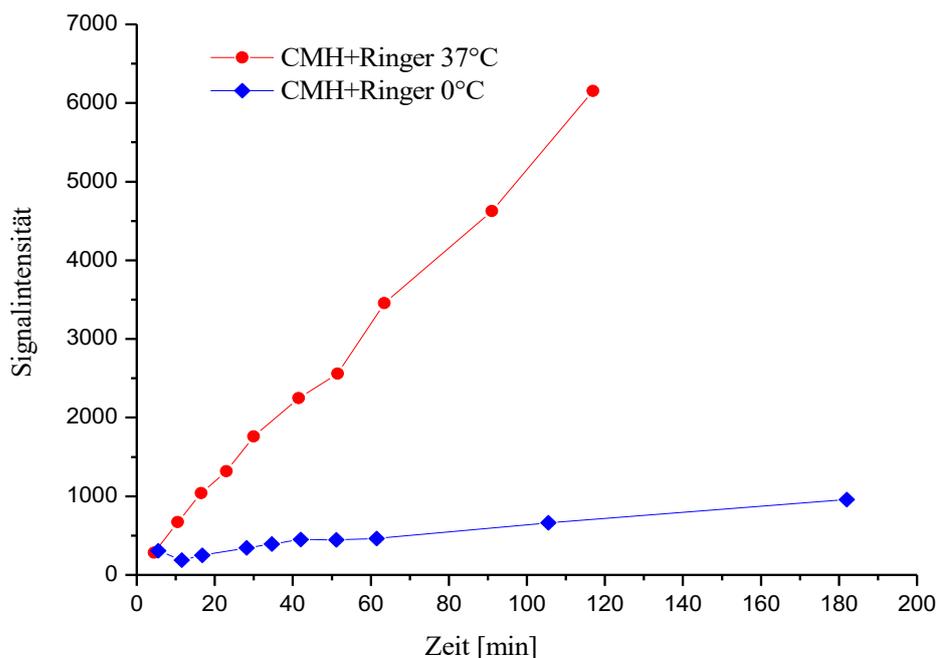


Abbildung 13: Eigensignal der CMH-Stocklösungen nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen.

Für 0°C gelagertes CMH (blaue Kurve) und für 37°C gelagerte CMH-Lösung (rote Kurve) wurde zu den angegebenen Messzeitpunkten ein Aliquot entnommen und in Ringer-Puffer gemessen.

4.3 ESR-Messungen an THP-1 Monozyten

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen die geeigneten Rahmenbedingungen evaluiert wurden, sollten jetzt Echtzeitmessungen an vitalen Zellen folgen.

Reaktive Sauerstoffspezies können von vielen verschiedenen Zellen und Enzymen generiert werden. Eine der Hauptquellen ist die NADPH-Oxidase (NOX), die Monozyten in einer bedeutenden Menge (Isoform NOX-2) exprimieren (Kapitel 2.2 und 2.3).

Zunächst wurden Versuche an Monozyten der Zelllinie THP-1 durchgeführt. (Abbildung 14), die mit dem Phorbolster PMA stimuliert wurden. Während der Messzeit von 25 min produzieren die mit PMA stimulierten Zellen signifikant mehr Superoxidradikale als die nicht stimulierten Zellen; mit $10,5\mu\text{M}$ gegenüber $5\mu\text{M}$ mehr als doppelt so viel nach 23 Minuten (schwarze Kurve vs. rote Kurve). Die Bildungsrate von Superoxid der stimulierten THP-1 Zellen ist etwa 2,6-mal höher als die der nicht stimulierten Zellen, wie aus den Steigungen der linearen Fits der Datenpunkte über die ersten 12 min zu erkennen ist.

Diese PMA-induzierte Superoxidradikalproduktion ist nach Zugabe von SOD nicht mehr nachzuweisen (grüne Kurve) und ist nahezu identisch mit der Basisrate nicht stimulierter Zellen (rote und grüne Kurve). Durch die Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) in die Messlösung stimulierter Monozyten wird Superoxid effektiv in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt. Beide Substanzen reagieren nicht mit CMH. Unterschieden sich die hierbei detektierten ESR-Signale nicht von denen unstimulierter Zellen, musste es sich bei den mit CMH reagierten Radikalen also um Superoxidradikale handeln.

Deshalb wurden bei jedem Versuch immer auch mehrere Kontrollexperimente unter Zugabe von SOD gemacht, sodass die Messung von Superoxid als reaktive Sauerstoffspezies bewiesen werden kann. Die Quantifizierung der Superoxidradikale gelang wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben mittels einer $100\mu\text{M}$ Tempollösung, die als Referenz diente.

Auch bei den Messungen an lebenden Zellen stellt sich die Frage nach der Temperaturabhängigkeit der Superoxidproduktion. Abbildung 15 zeigt ein repräsentatives Ergebnis der ROS-Produktion von THP-1-Monozyten nach Stimulation mit PMA bei Raumtemperatur (22°C schwarze Kurven) und bei normaler Körperkerntemperatur (rote Kurven). Nach 40 Minuten werden von mit PMA stimulierten Monozyten bei 37°C mehr als doppelt so viel Superoxidradikale produziert wie bei 22°C . Als Vergleichswerte sind nicht-stimulierte THP-1 Monozyten in der jeweiligen Messtemperatur (22°C schwarz offene Symbole, 37°C rot offene Symbole) angegeben. Die unstimulierten Zellen bei 37°C liegen im Bereich der stimulierten Zellen bei einer Temperatur von 22°C , aber deutlich höher als die unstimulierten Zellen bei 22°C .

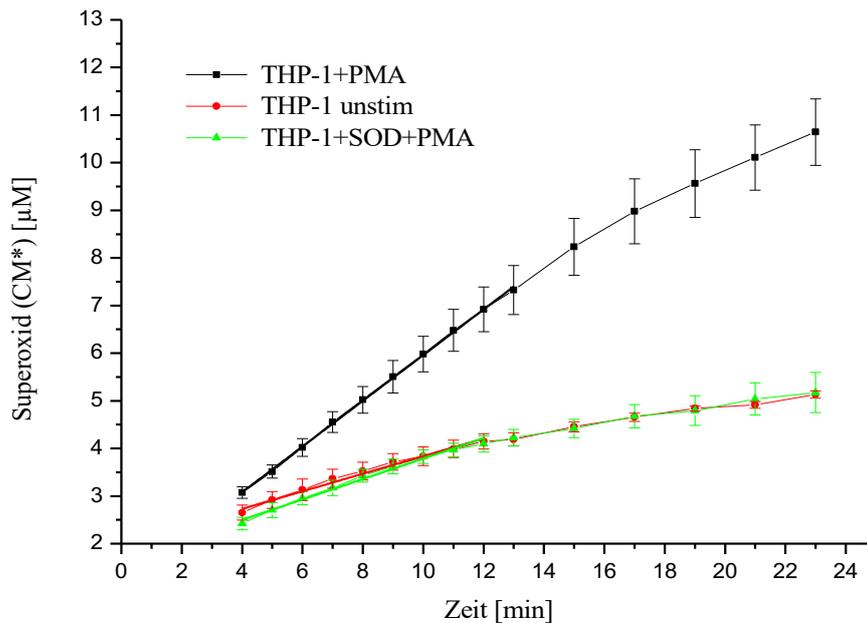


Abbildung 14: Superoxidproduktion der THP-1-Monozyten bei 37°C.

Monozyten mit 1µM PMA stimuliert (schwarze Kurve, n = 7), Monozyten ohne Zugabe eines Stimulus (rote Kurve, n = 7) und Monozyten unter Zugabe von SOD 100U/ml + 1µM PMA (grüne Kurve, n = 4). Dargestellt sind die Mittelwerte, die Balken repräsentieren den Standardfehler. Lineare Fits sind für die ersten 12 Minuten in der jeweiligen Farbe als Geradenstücke angegeben (schwarz $0,480 \pm 0,004 \mu\text{M}/\text{min}$, rot $0,184 \pm 0,007 \mu\text{M}/\text{min}$ und grün $0,214 \pm 0,009 \mu\text{M}/\text{min}$; $R^2 > 0,988$)

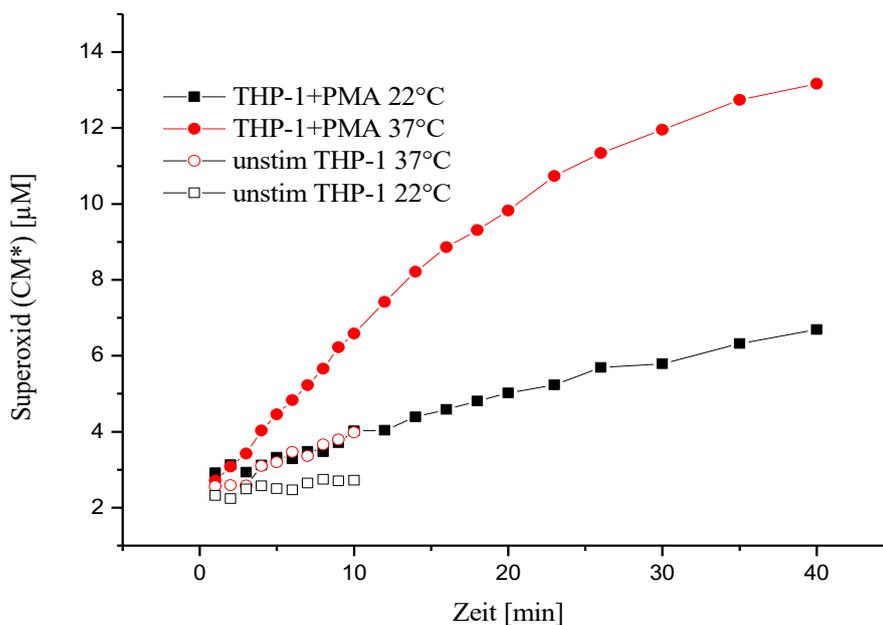


Abbildung 15: Temperaturabhängigkeit der ROS-Produktion von THP-1 Monozyten.

Einzelmessungen von THP-1 Monozyten bei 37°C (rote Symbole) und bei 22°C (schwarze Symbole). Die initialen Anstiege unterschieden sich deutlich in Abhängigkeit von der Temperatur.

4.4 ESR-Messungen an CD14⁺ Monozyten von gesunden menschlichen Spendern

Es war nun ein Versuchsaufbau etabliert, der verlässliche Ergebnisse liefert und auch für die Messungen von lebenden Zellen geeignet ist. Als nächstes stellte sich die Frage, wie sich lebende Monozyten von gesunden menschlichen Spendern von den THP-1 Monozyten unterscheiden werden. Außerdem sollte geklärt werden, welche Menge an Superoxidradikalen im Durchschnitt produziert wird, ob es mittels ESR möglich ist, Aussagen über die wichtigsten Signalwege bei der Superoxidproduktion von CD14⁺ Monozyten zu treffen, und inwiefern Kalzium bei der Signaltransduktion eine Rolle spielt.

Hierfür wurden in den folgenden Versuchen CD14⁺ Monozyten von gesunden menschlichen Spendern verwendet. Die Isolation und Vorbereitung der Monozyten erfolgten wie in Kapitel 3.5 und 3.51 beschrieben. Für die jeweiligen Experimente wurden $2,5 \cdot 10^5$ Monozyten pro Messung eingesetzt, die bei 37°C durchgeführt wurden. Die Ergebnisse wurden generell auf 10^6 Zellen normiert.

Abbildung 16 zeigt die mikromolare Konzentration an Superoxidradikalen, die von den CD14⁺ Monozyten in 1mM Ca²⁺-Ringerpuffer nach Stimulation mit 1µM PMA nachgewiesen wird. Außerdem ist die Menge an Superoxidradikalen dargestellt, die bei Zugabe des Inhibitors der NADPH-Oxidase (Diphenyleneiodoniumchloride, DPI) und Stimulation messbar wurde, und die Menge der produzierten ROS unter Zugabe von SOD und Stimulation. Die unstimulierten Zellen zeigen lediglich das zu erwartende Hintergrundsignal (rote Kurve). Die Stimulation mit PMA führt zu einer deutlichen Produktion an Superoxidradikalen (schwarze Kurve). Vergleicht man die auf 10^6 Zellen normierten Absolutwerte nach 20 min zwischen den THP-1 Monozyten und den Monozyten gesunder menschlicher Spender (Abb. 14 und 16 jeweils schwarze Kurve), so lässt sich eine neunfach höhere Konzentration an Superoxidradikalen ablesen. Ein weiterer deutlicher Unterschied in diesem Vergleich ist die Reaktionskinetik. Über den 20-minütigen Messverlauf zeigen die THP-1 Zellen einen nahezu linearen Kurvenverlauf (Abb. 14, schwarze Kurve), wohingegen die CD14⁺ Monozyten schon bei einer hohen Signalintensität nach Beginn der Stimulation starten und zudem vor der 10. Minute in eine Sättigung übergehen (Abb. 16 schwarze Kurve). Zudem ergibt sich aus den $n = 7$ Messungen der fünf Spender eine deutlich größere Streuung der einzelnen Messkurven als für die Zelllinie THP-1, wie aus den Balken für den Fehler des Mittelwertes zu sehen ist (schwarze Kurven in Abb. 16 und 14).

Sowohl nach Zugabe von DPI (blaue Kurve) als auch durch die Zugabe von SOD (grüne Kurve) reduziert sich die gemessene ROS-Produktion nach Stimulation mit PMA drastisch. Sie liegt dann etwa auf dem Niveau der unstimulierten Zellen.

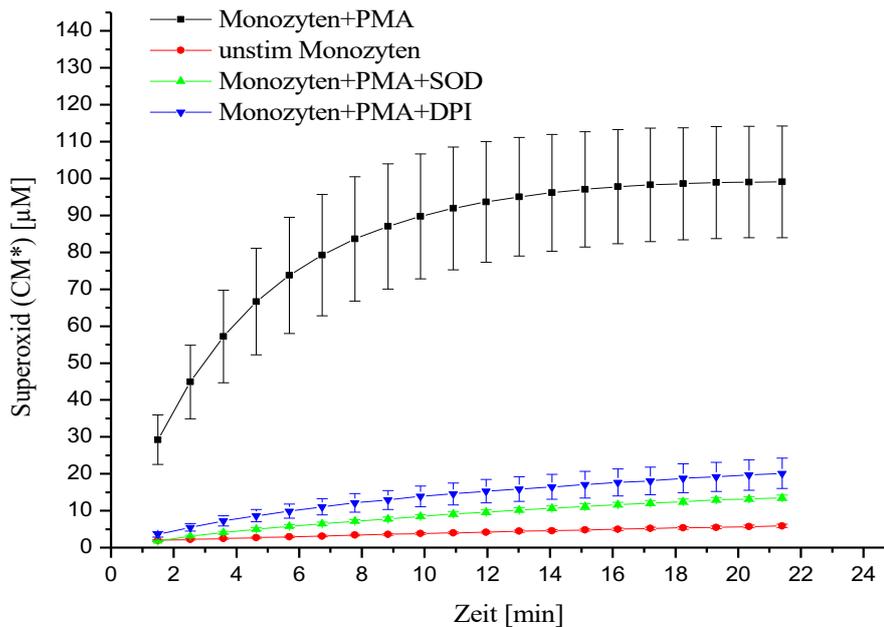


Abbildung 16: Superoxidproduktion von CD14⁺ Monozyten bei 37°C (Teil 1).

Spenderanzahl $n = 5$. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = 7$ schwarz-, grün- und blaue Kurve, $n = 13$ rote Kurve) und die Balken geben den Standardfehler wieder. CD14⁺ Monozyten in 1mM Ca²⁺-Ringerpuffer nach Stimulation mit 1µM PMA (schwarze Kurve), nach Zugabe von SOD 100U/ml und 1µM PMA (grüne Kurve), nach Stimulation mit 1µM PMA und 10µM DPI (blaue Kurve), sowie nicht stimulierte CD14⁺ Monozyten (rote Kurve).

Nach diesen Ergebnissen sollte nun gezeigt werden, dass die nach Stimulation produzierte Superoxidmenge auch tatsächlich durch PMA induziert wird. Hierzu wurde das eben vorgestellte Experiment wiederholt und die Menge an Superoxidradikalen, die nach Stimulation mit PMA zu messen ist, mit jener von nicht stimulierten Monozyten und Monozyten nach der Zugabe des Stereoisomers von PMA, 4alpha-PDD verglichen (Abbildung 17A).

4alpha-PDD induziert offensichtlich keine Superoxidproduktion (hellgraue Kurve). Außerdem ist zu sehen, dass die mit PMA stimulierten Monozyten nach Zugabe des Proteinkinase C Inhibitors BisGö keine Superoxidradikale produzieren (braune Kurve).

Um die Übersicht zu verbessern, wurde in Abbildung 17B der y-Achsen-Abschnitt bis zur Superoxid-Konzentration von 20 µM aus dem Teildiagramm 17A vergrößert. Hier kann man erkennen, dass die mit PMA stimulierten Monozyten nach Zugabe von BisGö bzw. die mit 4-alpha-PDD stimulierten Monozyten im Vergleich zu den nicht stimulierten Monozyten keine nennenswerte Superoxidproduktion aufweisen und sich nahezu identisch verhalten.

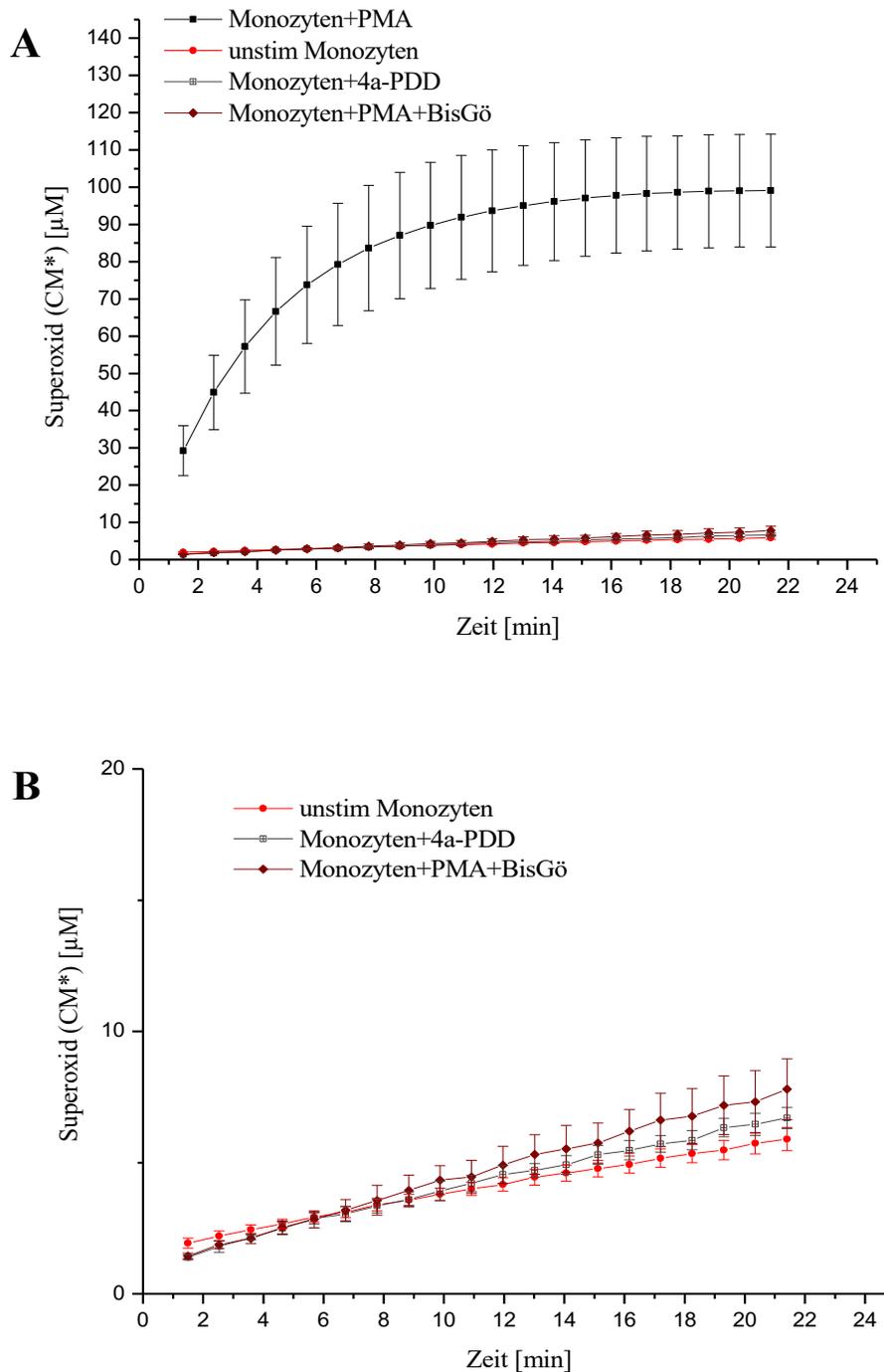


Abbildung 17: Superoxidproduktion CD14^+ Monozyten bei 37°C (Teil 2).

Nach Stimulation mit $1\mu\text{M}$ PMA (schwarze Kurve), $1\mu\text{M}$ PMA + $0,5\mu\text{M}$ Bis/Gö (braune Kurve), nach Zugabe von $1\mu\text{M}$ 4alpha-PDD (graue Kurve) und nicht stimulierte CD14^+ Monozyten (rote Kurve). Spender $n=5$, schwarze Kurve $n=7$, rote Kurve $n=13$ alle weiteren Kurven $n=4$. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Balken geben den Standardfehler an. Nur die mit PMA stimulierten Zellen zeigen eine starke Superoxidproduktion, diese kann mit BisGö gehemmt werden. 4alpha-PDD stimuliert die Monozyten nicht zu einer Superoxidproduktion (A). In der Ausschnittsvergrößerung der Abbildung des Bereichs bis $20\mu\text{M}$ Superoxidradikale (B) zeigt sich ein nahezu identisches Verhalten der CD14^+ Monozyten.

4.5 Kalziumabhängige Superoxidradikalproduktion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit die extrazelluläre Kalziumkonzentration eine Rolle in der Superoxidproduktion der mit PMA stimulierten Monozyten spielt.

Die folgende Abbildung 18 zeigt die Daten der mit PMA stimulierten CD14⁺ Monozyten aus Abbildung 16 im Vergleich mit einer Versuchsreihe, in der die Monozyten in kalziumfreiem Ringerpuffer mit PMA stimuliert werden. Sowohl die in Ringerlösung mit nahezu physiologischer Kalziumionenkonzentration (1mM) stimulierten Monozyten (schwarze Kurve), als auch die Monozyten in kalziumfreier Ringerlösung (braune Kurve, nicht ausgefüllte Quadrate) produzieren statistisch vergleichbare Mengen an Superoxid. Einzig der höhere Standardfehler im kalziumfreien Puffer unterscheidet die beiden Messreihen.

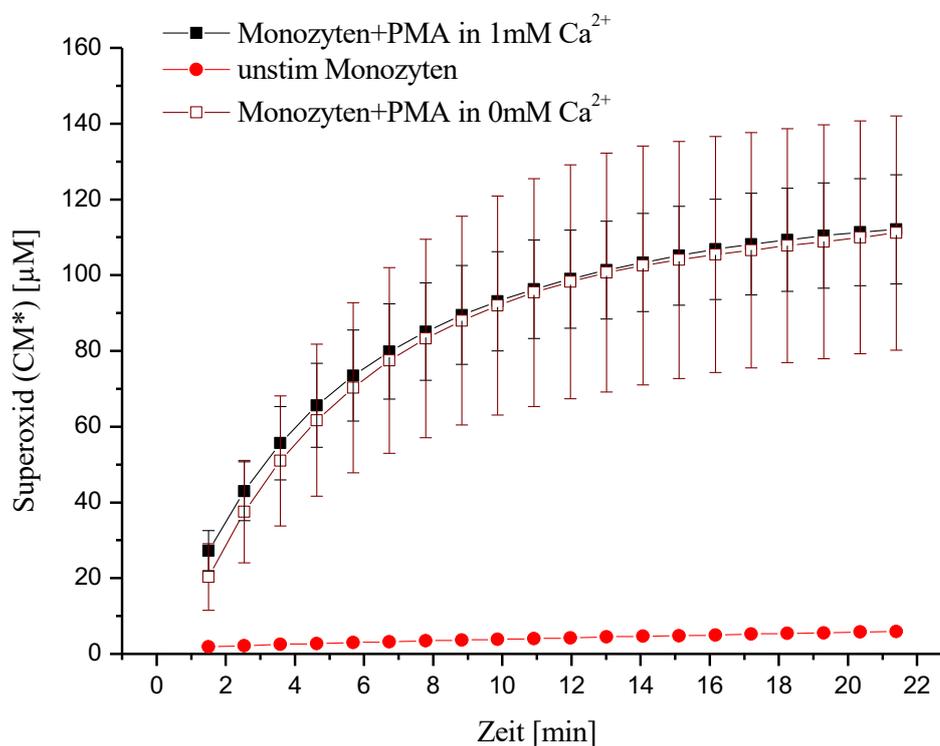


Abbildung: 18 Superoxidproduktion CD14⁺ Monozyten mit und ohne extrazelluläres Kalzium im Vergleich nach PMA-Stimulation.

Spender n = 5, schwarze Kurve n = 7, braune Kurve n = 3, rote Kurve n = 13. Gezeigt sind die Mittelwerte mit dem jeweiligen Standardfehler. Die braune Kurve (0mM Ca²⁺) und die schwarze Kurve (1mM Ca²⁺) unterschieden sich nicht bei Stimulation mit 1µM PMA.

Alle Messungen nach Stimulation mit PMA zeigen eine hohe Radikalproduktion und ein typisches Sättigungsverhalten. Es sollte die Kinetik der Superoxidproduktion charakterisiert werden, deshalb wurde die Produktion in den ersten Minuten der Versuche ausgewertet.

Hier läuft die ROS-Produktion durch die NOX-2 mit maximaler Geschwindigkeit ab. Hierzu wurde die Steigung der Kurven für die ersten Messpunkte mit einer Geradenfunktion angepasst und in $\mu\text{M}/\text{min}$ angegeben. In Abbildung 19 sind die Kurven mit ihrer jeweiligen Produktionsrate an Superoxidradikale in $\mu\text{M}/\text{min}$ gezeigt. In den ersten Minuten wird nach Stimulation mit PMA die fast siebzigfache Menge an Superoxidradikalen von $13,9 \mu\text{M}$ pro Minute erzeugt gegenüber $0,2 \mu\text{M}/\text{min}$ für die unstimulierten Zellen (rote Gerade vs. grüne Gerade).

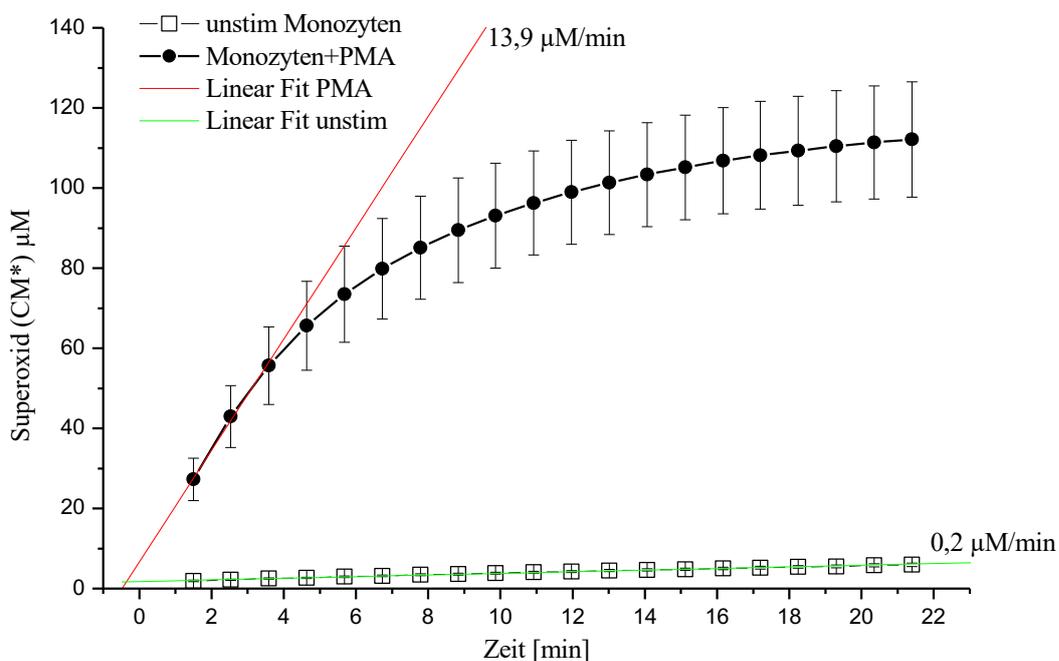


Abbildung 19: Kinetik der Superoxidproduktion stimulierter und nicht stimulierter Monozyten.

Spender $n = 5$, schwarze Kurve $n = 7$, graue offene Quadrate $n = 13$. Gezeigt sind die Mittelwerte mit dem jeweiligen Standardfehler. Die durchgezogene rote Gerade gibt die initiale Steigung der schwarzen Kurve in $\mu\text{M}/\text{min}$ für den anfänglichen linearen Anstieg wieder. Die durchgezogene grüne Gerade zeigt die Steigung für die unstimulierten Monozyten (offene Quadrate) ebenfalls in $\mu\text{M}/\text{min}$. (Fehler beider linearen Fits $< 10^{-6}$)

Nachdem nun offensichtlich die nach PMA-Stimulation über die NADPH-Oxidase generierte Superoxidproduktion kein extrazelluläres Kalzium benötigt, stellt sich die Frage, ob und wie Kalzium als wichtiges Ion in der zellulären Signaltransduktion eine Rolle spielt. Hierfür wurde zu den Monozyten der kompetitive Inhibitor der SERCA-Pumpe Thapsigargin (Tg) zugefügt.

Diese Versuchsreihe ist in Abbildung 20 gezeigt. Nach der Stimulation mit Thapsigargin in Gegenwart von 1mM Ca^{2+} im Puffer zeigt sich eine deutlich andere Kurvenform mit einem sigmoidalen Verlauf (schwarze Kurve). Die unterschiedlichen Produktionsraten für die ersten 4 min und den nächsten 7 min sind als blaue und rote angepasste Gerade in den Kurvenverlauf eingezeichnet. Sie ergeben näherungsweise eine Konzentrationszunahme von zunächst $0,9 \pm 0,1\mu\text{M}/\text{min}$ und danach von $2,2 \pm 0,04\mu\text{M}/\text{min}$.

Verglichen mit den bisherigen Ergebnissen nach Stimulation mit PMA unterscheidet sich die Radikalproduktion sowohl in der absoluten Menge als auch in der Produktionsrate in $\mu\text{M}/\text{min}$. Nach Stimulation mit Thapsigargin sind die Werte deutlich niedriger. Die Produktionsrate um den Faktor 6 und auch die Absolutwerte nach 20 Minuten sind etwa um den Faktor 3,5 geringer (Abb. 20 vs. Abbildung 19, schwarze Kurve und rote Gerade). Die Hemmung der NOX durch DPI und Proteinkinase C durch BisGö unterdrücken die ROS-Produktion deutlich (grüne und olive Kurve). Die Stimulation mit Thapsigargin in kalziumfreier Ringerlösung führt zu keinerlei Produktion an Superoxidradikalen (grau) und liegt noch unterhalb der unstimulierten Monozyten.

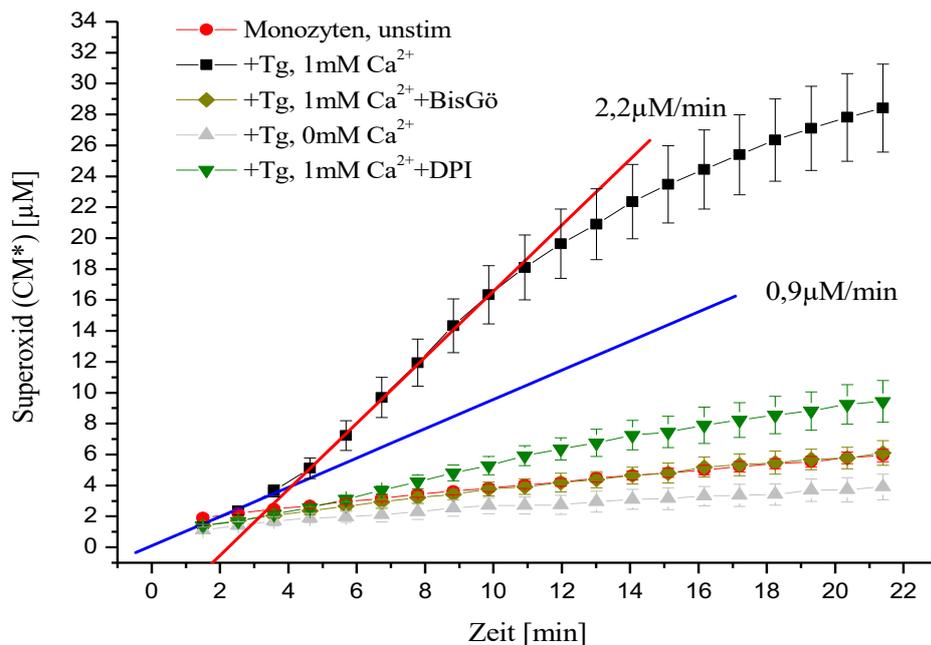


Abbildung 20: Superoxidproduktion der mit Thapsigargin stimulierten Monozyten.

Spender $n = 4$. Dargestellt sind die Mittelwerte $n = 13$ (rot), $n = 4$ alle anderen Kurven; die Balken geben den Standardfehler an. CD14^+ Monozyten mit $2\mu\text{M Tg}$ (schwarze Kurve); CD14^+ Monozyten mit $2\mu\text{M Tg} + 10\mu\text{M DPI}$ (grün); CD14^+ Monozyten mit $2\mu\text{M Tg} + 0,5\mu\text{M BisGö}$ (olive Kurve); CD14^+ Monozyten mit $2\mu\text{M TG}$ in kalziumfreier Ringerlösung (graue Kurve) und unstimulierte CD14^+ Monozyten ohne Zusatz (rot). Teile dieser Abbildung wurden in [83] veröffentlicht.

Um die Übersicht zu verbessern, wurde aus Abbildung 20 der y-Achsenabschnitt zwischen 0 und 12 μM gespreizt und mit gleicher Farbkodierung in Abbildung 21 dargestellt.

Hier ist zu erkennen, dass DPI die Produktion von Superoxid deutlich unterdrückt und nur noch eine Rate von $0,38 \pm 0,025 \mu\text{M}/\text{min}$ bzw. $0,52 \pm 0,006 \mu\text{M}/\text{min}$ aus den Fitgeraden (grün, durchgezogen) abzulesen ist. Der sigmoidale Verlauf ist noch ansatzweise zu sehen, so dass die linearen Fits auf ähnliche Zeitabschnitte wie in Abb. 20 angewendet wurden. Zugabe des Proteinkinase C Hemmstoffes BisGö verringert die Produktionsrate nochmals deutlich auf einen Wert von $0,252 \pm 0,005 \mu\text{M}/\text{min}$ (oliv) in die Nähe des Wertes für die unstimulierten Zellen ($0,203 \pm 0,003 \mu\text{M}/\text{min}$, rot). Die Stimulation mit Thapsigargin in kalziumfreier (0mM) Messlösung liegt mit ihrer Steigung von $0,143 \pm 0,006 \mu\text{M}/\text{min}$ (grau) unterhalb der unstimulierten Monozyten in kalziumhaltiger (1mM) Puffer (rot).

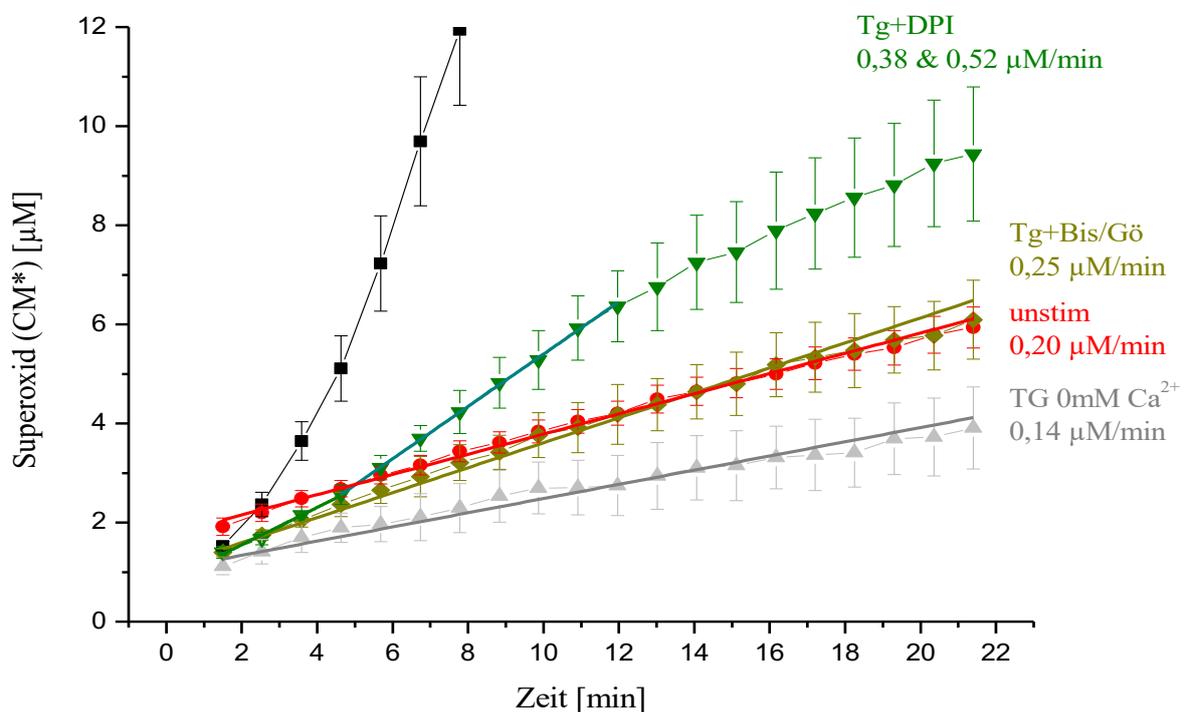


Abbildung 21: Vergrößerte Darstellung der Stimulation mit Thapsigargin aus Abb.20.

Die Farbkodierung wurde beibehalten. Es gelten dieselben Angaben wie in Abb.20. Die Messdaten wurden mit linearen Funktionen angepasst, um die Steigungen als Produktionsraten zu ermitteln. Bis auf die Daten der $\text{CD}14^+$ Monozyten mit $2\mu\text{M}$ Tg + $10\mu\text{M}$ DPI (grün) wurden alle Messpunkte in den Fit eingeschlossen. Hier wurde wegen der sigmoidalen Kurvenform ähnlich wie in Abb.20 die linearen Fits über die ersten 4 min und die nächsten 7 min durchgeführt. Die Steigungswerte sind für die einzelnen Versuchsabläufe angegeben. Auch dieser Ausschnitt wurde in Teilen in [83] veröffentlicht.

Kapitel 5 Diskussion

5.1 Methodik und Rahmenbedingungen

ROS spielen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle und sind vor allem in den letzten Jahren in den Fokus vieler wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt (siehe auch Kapitel 2). Zum einen spielen sie wichtige Rollen in der Immunabwehr und Signalübermittlung zwischen Zellen im Organismus, zum anderen können sie schwere Zellschäden und Krankheiten hervorrufen [68,107]. Gerade weil ROS vielfältige Aufgaben und Effekte haben, ist das genaue Messen zum Charakterisieren und Quantifizieren wichtig. Aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften stellt das Messen jedoch eine große Herausforderung dar (Kapitel 2.1 und 2.5). Es existieren eine Reihe verschiedener Messverfahren, die auf verschiedene Mitglieder der ROS-Familie fokussiert sind und verschiedenen Vor- und Nachteilen haben [30,32,51,56,67]. Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der ESR als Messmethode (Kapitel 2.5 und 2.6). Von anderen Arbeitsgruppen häufig verwendete Messmethoden, um ROS zu messen, sind vor allem Chemilumineszenz und Fluoreszenz bzw. photometrische Methoden.

Mit Chemilumineszenz ist es möglich, sowohl intra- als auch extrazelluläre Superoxidradikale zu messen. Es ist eine weit verbreitete Methode, welche Superoxidradikale spezifisch erkennen kann, z.B. mittels Lucigenin. Bei der Reaktion mit dem zu messenden Radikal emittiert der jeweilige „Nachweisstoff“ ein Photon. Über diese Abgabe von Lichtquanten ist eine Messung von Radikalen möglich. Diese Methode weist jedoch auch deutliche Schwächen auf. Es kann zu einem sogenannten „Redox-cycling“ kommen. Hierbei reagiert das messbare Lucigeninradikal wiederum selbst mit molekularem Sauerstoff und es entstehen neue Radikale. Die Menge der Superoxidradikale kann somit falsch zu hoch bestimmt werden [27,60,61,102].

Die Messung von ROS mit Farbindikatoren wird ebenfalls häufig angewendet. So werden Superoxidradikale schon Jahrzehnte in der Literatur vor allem durch Cytochrom-c-Reduktion photospektrometrisch bestimmt [3,41]. Allerdings ist sie bei niedrigen Konzentrationen von ROS nicht sensitiv genug und zeigt eine hohe Variabilität der Ergebnisse [27,109]. Einen weiteren häufig genutzten Ansatz in der Messung ROS bietet die Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mittels Amplex Red. Dieser farblose nicht fluoreszierende Stoff reagiert mit H_2O_2 zu Resorufin, einem stark fluoreszierenden Agens. Es ist eine sehr sensitive und spezifische Messmethode [27,65,109].

Allerdings lässt sich ausschließlich extrazelluläres H_2O_2 messen. Auch müssen verschiedene Störfaktoren, wie z.B. die lichtinduzierte Reduktion von Resorufin oder die Interaktion mit Superoxid ausgeschlossen werden [54,65,101].

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der ESR-Spektroskopie besitzt ihre Stärken in der genauen Quantifikation und Charakterisierung der ROS [27,30,32]. Vor allem lässt sich der primäre Vorläufer aller ROS, das Superoxid (Abbildung 1), sehr direkt und ohne Umwege über mehrstufige Hilfsreaktionen messen. Um ROS und im speziellen Superoxidradikale mittels ESR messen zu können, bestehen verschiedene Ansätze. Die Vor- und Nachteile des Spintrapping gegenüber der Verwendung von redox-aktivierten Spinproben sind in Kapitel 2.5.3 ausführlicher erklärt. Spinproben aus der Gruppe der zyklischen Hydroxylamine eignen sich aufgrund ihrer hohen Reaktionskonstante besonders gut für genaue Messungen und Quantifizierung von kurzlebigen Radikalen. Ihr Vorteil ist, dass sie in niedrigen Konzentrationen (100 - 300 μ M) eingesetzt werden können, und somit das zelluläre System kaum beeinflussen. Spintraps aus der Gruppe der Nitrone hingegen müssen wegen der niedrigen Reaktionskonstante in deutlich höheren Konzentrationen (100mM) eingesetzt werden.

Eines der Hauptziele (Kapitel 2.6) dieser Arbeit war es, ein Messprotokoll zu erstellen, welches eine möglichst genaue Aussage über die Reaktionskinetik und die tatsächliche produzierte Menge an Superoxidradikalen liefert. Eine Unterscheidung von ROS in verschiedenen Zellkompartimenten war nicht Ziel dieser Arbeit. Deshalb wurden für die Experimente Spinproben eingesetzt. Im Gegensatz zu Spintraps ist die direkte Identifikation des gemessenen Radikals mit Spinproben nicht möglich, weshalb zum Nachweis des gemessenen Superoxidradikals SOD hinzugegeben wurde (siehe auch Kapitel 5.2).

Die bis zu diesem Zeitpunkt empfindlichsten und geeignetsten Spinproben zum Messen von Superoxidradikalen – ohne zwischen intra- und extrazellulären Radikalen zu unterscheiden – sind CMH und CPH [29–32,105]. CMH soll jedoch eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Radikalen haben [29,31]. Ein vergleichender Test der beiden Spinproben (CMH und CPH) bestätigte die höhere Empfindlichkeit von CMH (Abbildung 10). Hier ist vor allem der deutliche Unterschied in der Steigung (Faktor 2,64) in den ersten 20 Minuten der Reaktion des X/XO-Modells zu vermerken, der den Unterschied der Empfindlichkeiten widerspiegelt. Je länger die Reaktionen und Messungen andauern, umso mehr muss auch bei diesen Spinproben immer mit sekundären Reaktionen wie Radikalvernichtungsphänomenen gerechnet werden.

Vor diesem Hintergrund sollte in folgenden Messungen und Untersuchungen eine Reaktionsdauer definiert werden, die Störfaktoren wie Sättigungsphänomene und Radikalvernichtung möglichst unwahrscheinlich macht. Die Messdauer wurde auf maximal 25 Minuten beschränkt.

Messungen reaktiver Sauerstoffspezies an lebenden Zellen sind kompliziert. Hier bestehen durch eine Vielzahl von enzymatischen Prozessen, Proteinen, unterschiedlichen Molekülen und Reaktionswegen vielfältige Störeinflüsse auf die Messungen [31,32,44]. Gerade darum ist es so wichtig, störende Hintergrundsignale und Artefakte möglichst auszuschließen oder gering zu halten. Zyklische Hydroxylamine formen stets das gleiche Radikal (CM^*) mit dem typischen Spektrum eines NO-Radikals. Eine Unterscheidung zwischen möglichen Hintergrundsignalen, z.B. durch Verunreinigung der Messlösung, und tatsächlichem Messsignal, oder primäre Aussagen zur Art des ursprünglichen Radikals sind ohne zusätzliche Untersuchungen nicht ohne weiteres möglich. Die Gefahr so entstehender möglicher Fehldeutungen der Ergebnisse musste minimiert werden. Um mögliche Hintergrundsignale als Störfaktoren aus der Messlösung ausschließen zu können, wurden isotonische 0,9%-ige NaCl Lösung, Ringerlösung und Krebs-Hepes Pufferlösung als Messlösung gegeneinander getestet (Abbildung 11). Hier hat sich gezeigt, dass die Ringerlösung und die Kochsalzlösung keine nennenswerten Hintergrundsignale aufweisen. Der Krebs-Hepes-Puffer, der als Messlösung für die Messungen von ROS an lebenden Zellen weit verbreitet und empfohlen wird [25,30,32], zeigte hier ein unerwartetes Ergebnis. Obwohl der eigens für ESR-Spektroskopie vertriebene Krebs-Hepes-Puffer benutzt wurde, produzierte genau diese Messlösung das größte Hintergrundsignal. Eine Verunreinigung der Lösung durch unser Labor ist höchst unwahrscheinlich, da dort auch beide anderen Messlösungen angesetzt wurden und das Phänomen nur bei dem Krebs-Hepes-Puffer auftrat. Eine mögliche Erklärung ist, dass in dieser Messlösung gehäuft Metallionen vorhanden sind, die auch durch das zugesetzte DF und DETC nicht vollständig gebunden werden konnten und so zusätzliche Redoxreaktionen mit der Spinprobe bzw. Sauerstoff stattfinden.

Außerdem muss noch eine weitere Möglichkeit diskutiert werden. Seit Mitte der 80er Jahre ist ein lichtabhängiges Phänomen der Puffersubstanz HEPES bekannt. Es wird die lichtabhängige Reduktion von Sauerstoff durch HEPES zu letztendlich Wasserstoffperoxid beschrieben [59,113]. Die Konzentration von HEPES in der Krebs-HEPES-Lösung ist 4-fach höher als in der Ringer-Lösung und die auf der Homepage von Noxygen in Bezug auf Metallionen beschriebene Reinheit, des benutzten Krebs-HEPES-Puffers ist hoch (Eisen- und Kupferionen $\leq 0,005$ ppm).

Es ist also ebenso möglich, dass eine erhöhte Lichtexposition und die höhere HEPES-Konzentration zu vermehrter ungewollter Reduktion des Sauerstoffs in der Krebs-HEPES-Pufferlösung geführt haben, was das unerwartet hohe Hintergrundsignal in der Krebs-HEPES-Lösung verursachen könnte.

Aus diesen Befunden lässt sich vor allem schließen, dass vor den eigentlichen Versuchen stets eine Evaluation der geeignetsten Messlösung erfolgen sollte, um eine Verzerrung der Versuchsergebnisse durch zu starke Eigen- oder Hintergrundsignale so weit wie möglich auszuschließen. Außerdem erfordern sämtliche Vorbereitungen die größtmögliche Reinheit der Materialien und Sorgfalt hinsichtlich der Herstellung von Puffern, Stocklösungen und Reagenzien. Für diese Arbeit wurde eine Messlösung gesucht, die eine physiologische Umgebung für die Zellen bietet und gleichzeitig eine möglichst geringe Hintergrundsignalintensität aufweist. Die Ringerlösung erfüllte diese Voraussetzungen am besten (Abbildung 11), sodass sie eine optimale Lösung für die Versuche darstellte. In der Ringerlösung wurde dann in weiteren Versuchen die Kalziumkonzentration variiert.

Möchte man einen Versuchsaufbau etablieren, dessen Rahmenbedingungen so nah wie möglich an die physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Organismus herankommen, muss man als wichtigen Parameter die Temperatur anpassen (Abbildungen 12 und 15). Schon aufgrund der Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel (RGT-Regel) leuchtet ein, dass zum einen das Hintergrundsignal ansteigen wird und dass zum anderen eine Quantifizierung der ROS-Bildungsraten durch Zellen nur bei 37°C möglich ist, um möglichst nahe an physiologische Bedingungen zu kommen. Dank des Gas-Temperatur-Controllers konnten die Messungen in dieser Arbeit bei dauerhaft konstanten 37°C durchgeführt werden. Bis zum Erwerb des Gerätes mussten die Versuche bei Raumtemperatur und mit vorgewärmten Zellen durchgeführt werden.

Auch die Lagerungstemperatur der Spinprobe unterliegt diesem Gesetz. Hier war es also wichtig sicherzustellen, dass mit zunehmender Versuchsdauer, die Stocklösung der Spinprobe, nicht durch ein steigendes und unkontrolliertes Eigensignal, die Messung der ROS-Bildung verfälscht. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit (Abbildung 13) legen nahe, die Stocklösung ab einer Dauer von 120 Minuten erneut frisch anzusetzen. Die Lagerung der Stocklösung sollte innerhalb dieser Zeitspanne bei 0°C und möglichst unter Ausschluss von Sauerstoff erfolgen.

5.2 ESR-Messungen an THP-1 Monozyten und Vergleich der Kinetik mit den frischen CD14⁺ Monozyten

Monozyten sind für den menschlichen Organismus von großer Bedeutung. Sie übernehmen wichtige Aufgaben im angeborenen Immunsystem (Kapitel 2.3). Als professionelle Phagozyten beseitigen sie Krankheitserreger und aktivieren weitere Zellen des Immunsystems. Außerdem sind sie Vorläuferzellen weiterer wichtiger Zellen des Immunsystems [23,87,89].

Allerdings spielen Monozyten auch eine Rolle in Krankheitsprozessen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Autoimmunerkrankungen [17,37,55]. Monozyten besitzen in ihren Zell- und Phagosommembranen viel NOX-2. Dieses Enzym spielt ebenso eine Schlüsselrolle für das Erledigen ihrer bereits beschriebenen Aufgaben, wie für die Pathophysiologie der erwähnten Krankheiten [5,12,22,24,57]. Um die genauen Vorgänge in der Aktivierung der NOX-2 und der damit verbundenen Superoxidradikalproduktion in Monozyten besser verstehen zu können, wurden die nun diskutierten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Die ersten Experimente zur Messung von ROS an lebenden Zellen in Echtzeit wurden mit THP-1 Monozyten durchgeführt. Sie dienen in der Literatur häufig als Modell für die Untersuchung der Rolle von Monozyten in biologischen Systemen [18,66,77,98]. Nach Stimulation mit PMA konnte eine deutliche Produktion an ROS detektiert werden. Der Phorbol-ester PMA eignet sich laut der umfangreichen Literatur als starker Induktor der Proteinkinase C gut, Untersuchungen an Immunzellen durchzuführen und den respiratorischen Burst zu untersuchen [25,30,93,110]. Um festzustellen, ob es sich bei den produzierten Radikalen um Superoxidradikale handelt wurde SOD hinzugegeben. Dieses Enzym wandelt das durch PMA induzierte Superoxid mit ca. 10^4 -fach schnellerer Reaktionskonstante in Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff um als CMH mit dem Superoxidradikal reagiert [30]. Für diese beiden Produkte der SOD ist die hier angewandte ESR-Methode nicht empfindlich.

Da durch SOD das gemessene Signal der CM-Radikale auf das Hintergrundsignalniveau herabgesenkt werden konnte, musste es sich bei den produzierten Radikalen eindeutig um Superoxidradikale handeln (Abbildung 14).

Wie zu erwarten war, konnte außerdem gemäß der RGT-Regel ein deutlicher Unterschied zwischen der Superoxidradikalproduktion nach Stimulation mit PMA und Messung bei 22°C und 37°C festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass ein alleiniges Vorwärmen nicht ausreicht, um die Reaktionskinetik bei Körpertemperatur abzubilden.

Die Temperatur der vorgewärmten Messlösung gleicht sich während der Messung zu rasch der Umgebungstemperatur (22°C) an. Nach Stimulation unterschieden sich daher die Produktionsraten der „nur“ vorgewärmten Zellen deutlich von den bei 37°C gemessenen.

In unseren Experimenten ist die von der THP-1 Zelllinie erwartete Antwort auf die Stimulation mit PMA eingetroffen. Es gibt jedoch kritische Hinweise, diese Zellen als grundsätzliches Modell für die Aufgaben von Monozyten im menschlichen Organismus zu benutzen [10]. Die THP-1 Zellen exprimieren deutlich weniger CD14 und es ist eine weitaus geringere Empfindlichkeit gegenüber einer Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) beschrieben [9].

Nach identischer Behandlung von THP-1 Zellen und den Monozyten gesunder menschlicher Spender zeigte sich im direkten Vergleich auch in dieser Arbeit eine sehr viel geringere Superoxidradikalproduktion der THP-1 Zellen. Für die frisch isolierten CD14⁺ Monozyten konnte eine 9-fach höhere Absolutmenge an Superoxidradikalproduktion gemessen werden (Vergleiche Abbildung 14 und 16).

Neben den unterschiedlichen Absolutmengen an produzierten Radikalen konnte zudem eine unterschiedliche Reaktionskinetik der beiden Monozytenarten festgestellt werden. Während nach gleicher Stimulation bei THP-1 Monozyten über 20 Minuten ein nahezu linearer Anstieg in der Radikalproduktion zu verzeichnen ist, kommt es bei den Monozyten gesunder menschlicher Spender schon nach weniger als 10 Minuten eines linearen Anstiegs der Superoxidradikalproduktion zu einer Sättigung. Nach circa 10 Minuten ist kein weiterer nennenswerter Zuwachs an gemessenen Superoxidradikalen zu verzeichnen (Abbildungen 16 und 19). Verglichen mit der Superoxidradikalkonzentration bei Sättigung liegt die Spinprobe CMH in einer 3-fach höheren Konzentration vor. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass weiterhin produzierte Radikale aufgrund zu geringer Spinprobenkonzentration in der Messlösung nicht erfasst werden.

Vermutet wurde, dass die Sättigung etwas mit dem deutlich höheren Substratverbrauch bei den frischen Monozyten zu tun haben muss. In einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte eine simultane Messung der Superoxidproduktionsrate und des Sauerstoffverbrauchs mit Tetrathiatriarylmethyl durchgeführt werden. Diese Experimente zeigten, dass es sich bei dem Sättigungsverhalten nicht etwa um ein Sistieren der Enzymaktivität oder fehlende Messbarkeit produzierter Radikale handelt, sondern dass in der gasdichten Messkapillare aus Glas durch den Verbrauch des gelösten Sauerstoffs nicht mehr genügend Substrat vorhanden ist.

Sinkt die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in der Messkapillaren von ca. $220\mu\text{M}$ gegen $0\mu\text{M}$, so zeigt sich die Sättigungskinetik und die Radikalproduktion stoppt schließlich bei etwa gleich bleibender ESR-Signalintensität (ca. $110\mu\text{M}$) [74]. Dies bedeutet aber auch, dass - wenn bei einer CMH-Konzentration von $300\mu\text{M}$ und einer Substratkonzentration (O_2) von ca. $220\mu\text{M}$ die Sättigungskonzentration bei ca. $110\mu\text{M}$ Superoxid liegt (Abbildung 19) - ungefähr die Hälfte des vorher vorhandenen Sauerstoffes entweder nicht in Superoxid umgewandelt wird oder nicht durch CMH erfasst wird. Betrachtet man die in der Literatur angegebenen Reaktionskonstanten für die Oxidation von CMH durch Superoxid und die der spontanen Dismutation ($1,2 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $5 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [28,30], liegt der Schluss nahe, dass eben diese beiden Reaktionen konkurrieren. So lassen sich auch durch die hier durchgeführten Experimente die ähnlichen Reaktionskonstanten bestätigen.

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit bestätigen, dass THP-1 Monozyten eine grundsätzliche Möglichkeit bieten, das Verhalten von Monozyten (auch in Bezug auf die ROS Produktion) zu erforschen [18,48,77]. Jedoch werden auch hier die oben erwähnten Schwächen [9,10] der Zelllinie deutlich. Legt man den Fokus auf die genaue Kinetik und Quantifizierung, so sollte man, um Rückschlüsse auf das Verhalten im Organismus ziehen zu können, frische, aus Blut isolierte Monozyten verwenden. Außerdem zeigt sich, dass selbst die bis dato „schnellste“ Spinprobe CMH nur einen Teil aller Superoxidradikale messbar machen kann. Möchte man den Anspruch erheben, das gesamte Superoxid zu messen, so bedarf es Spinproben, deren Reaktionskonstante deutlich größer als die der spontanen Dismutation der Superoxidradikale in H_2O_2 und O_2 ist.

5.3 ESR-Messungen an Monozyten von gesunden menschlichen Spendern und kalziumabhängige (SOCE-abhängige) Superoxidradikalproduktion

Die meisten Studien zum Verständnis der Interaktion von ROS Produktion, NOX und kalziumabhängiger Signalwege wurden an Zelllinien und neutrophilen Granulozyten vorgenommen [4,14,18,29,47,69,106,108]. Auch wenn es logisch erscheint, aus den gewonnenen Erkenntnissen über andere Zellen der angeborenen Immunantwort auf das Verhalten der Monozyten zu schließen, so sollten diese – auch auf Grund der oben genannten Relevanz von Monozyten – trotzdem untersucht werden. Deshalb wurden für die weiteren Experimente dieser Arbeit Messungen an frischen CD14^+ Monozyten von gesunden menschlichen Spendern durchgeführt.

Auch die frischen Monozyten produzierten nach Stimulation mit PMA signifikante Mengen an ROS (Abbildung 16). Hierbei handelt es sich um Superoxid, denn nach Zugabe von SOD lässt sich kein relevantes CM-Radikalsignal darstellen. Um zu zeigen, dass die produzierten Superoxidradikale von der NOX stammen wurde der NOX-Inhibitor DPI hinzugegeben, wodurch die von PMA induzierte Superoxidradikalproduktion nahezu vollständig unterdrückt wird. Die gemessenen Superoxidradikale nach PMA-Stimulation mussten also von der NADPH-Oxidase stammen. Es sollte möglichst die komplette Signalkette nach Stimulation mit PMA durch die ESR nachvollzogen werden. Entsprechend wurden die Monozyten nach Zugabe von BisGö mit PMA stimuliert. BisGö hemmt die Proteinkinase C und verhindert somit die Phosphorylierung und letztendlich die Aktivierung der NOX (siehe auch Kapitel 2.2, 2.3 und Abbildung 3). Auch die Hemmung der Proteinkinase C ließ die PMA-induzierte Superoxidradikalproduktion verschwinden, sodass der Signalweg von PMA über die Proteinkinase C und NOX mittels ESR dargestellt werden konnte. Die Stimulation der Monozyten mit 4alpha-PDD, einem inaktiven Stereoisomer von PMA, zeigte keine Stimulation des respiratorischen Bursts und diente als erfolgreiche Negativkontrolle.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die bekannten Signalwege und Effekte von PMA mit dem erstellten Messprotokoll und ESR nachvollzogen werden konnten, sollten in weiteren Experimenten die Rolle von Kalzium untersucht werden.

Die Rolle von Kalzium in der Stimulation des respiratorischen Burst von Leukozyten ist schon seit der 1970er Jahren bekannt [80,84]. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration bei der Stimulation durch PMA scheint, vor allem bei der Stimulation von neutrophilen Granulozyten, keine Rolle zu spielen [58,88]. Der oben beschriebene und in dieser Arbeit dargestellte Mechanismus der Superoxidradikalproduktion nach der Stimulation mit PMA, ließ eine Abhängigkeit der Radikalbildung von der extrazellulären Kalziumkonzentration unwahrscheinlich erscheinen.

Um diese Vermutung zu verifizieren erfolgte zusätzlich die Stimulation der Monozyten mit PMA in kalziumfreier Messlösung. Es konnte die exakt gleiche Reaktionskinetik, wie in kalziumhaltiger Messlösung beobachtet werden. Somit zeigt auch diese Arbeit, dass die PMA induzierte Bildung von Superoxidradikalen in Monozyten unabhängig von extrazellulärem Kalzium ist (Abbildung 18).

Kalzium als Signalmolekül ebenso wie SOCE (Kapitel 2.4) spielen jedoch, im Unterschied zu der nicht physiologischen direkten Stimulation mit PMA, in der Bildung von ROS während des respiratorischen Burst bei der Immunantwort eine Schlüsselrolle [13,70,71,91,111].

So sollte im folgenden Teil dieser Arbeit der Fokus auf das Zusammenspiel von Kalzium und ROS-Bildung in Monozyten gelegt werden. Es galt, mittels ESR den Zusammenhang zwischen der Bildung von ROS und dem SOCE zu zeigen und zu charakterisieren.

Die Bedeutung des SOCE für die ROS-Bildung in Monozyten wurde mit Thapsigargin untersucht. Durch Thapsigargin wird die Kalziumpumpe SERCA geblockt, wodurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und somit der SOCE induziert wird [64].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Thapsigargin in Monozyten die Bildung von ROS induziert (Abbildung 20). Auch hier handelt es sich um Superoxid, da der Anstieg der CM-Radikalkonzentration unter Zugabe von SOD nicht nachzuweisen war.

Es fallen jedoch deutliche Unterschiede zu den bisherigen Ergebnissen der mit PMA stimulierten Monozyten auf. Die Reaktionskinetik unterscheidet sich erheblich.

Die Stimulation mit PMA weist die, bereits im vorherigen Kapitel besprochene, zunächst lineare Produktion von Radikalen auf. Diese geht nach Verbrauch des gelösten Sauerstoffs in eine Sättigungskinetik über. Dem gegenüber steht die sigmoidale Kinetik der Superoxidproduktion nach Stimulation mit Thapsigargin. Hier werden in den ersten Minuten der Messung zwei unterschiedliche Bildungsraten von 0,9- und 2,2 $\mu\text{M}/\text{min}$ durchlaufen (Abbildung 20). Außerdem unterscheiden sich die Bildungsraten der linearen Kurvenabschnitte um den Faktor 6 (2,2 $\mu\text{M}/\text{min}$, verglichen mit 13,9 $\mu\text{M}/\text{min}$). Betrachtet man die bekannten Mechanismen der NOX-Aktivierung und des SOCE (Kapitel 2.2 – 2.4), so muss diese unterschiedliche Kinetik Ausdruck der unterschiedlichen Stimulationsansätze und -zeitpunkte sein. PMA führt über die direkte Aktivierung der PKC zu einer Phosphorylierung der Untereinheit p47^{phox} der NOX. Das Enzym wird zusammengesetzt und beginnt direkt mit der Superoxidradikalproduktion. Dem gegenüber steht der Mechanismus über die Hemmung der SERCA-Pumpe. Hier spiegelt die sigmoidale Kinetik den deutlich früher ansetzenden Start in der Kette der Aktivierung der NOX wider. Wenn diese Aktivierung der NOX über den SOCE vermittelt ist, müssen nach dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zellmembranständige Kalziumkanäle geöffnet werden. Hierdurch kommt es dann zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle, einer weiteren Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und erst dann zu einer Aktivierung der PKC und NOX.

Genau dieser Signalweg sollte mittels ESR bewiesen werden. Führt man die identische Stimulation der Monozyten mit Thapsigargin in kalziumfreiem Ringerpuffer durch, so lässt sich keinerlei Superoxidradikalproduktion feststellen (Abbildung 20 und 21). Dies beweist die entscheidende Rolle des SOCE in der Aktivierung der NOX-2 in Monozyten.

Ebenso lassen sich die Tg-induzierte Superoxidradikalproduktion in kalziumhaltiger Messlösung durch die jeweilige Zugabe des PKC-Inhibitors BisGö und des NOX-Inhibitors DPI unterbinden. Somit ließ sich zeigen, dass die SOCE-vermittelte Superoxidproduktion durch die Aktivierung der PKC und nachfolgend der NOX-2 hervorgerufen wird.

5.4 Abschluss und Ausblick

Einer der Hauptkritikpunkte für eine standardmäßige Anwendung der ESR ist ihre gerätetechnische Komplexität und die damit verbundene Übungsintensität für die verschiedenen Untersuchungen biologischer Systeme [27,32,46].

Diese Arbeit konnte ein Messprotokoll etablieren, das es unserer Arbeitsgruppe ermöglicht, die Elektron-Spin-Resonanz Spektroskopie für die Messung von Superoxidradikalen an lebenden Zellen routinemäßig zu benutzen. Für festgelegte Standardparameter des Spektrometers und durch das Messprotokoll konnten gut reproduzierbare Daten für die verschiedenen Experimente erhalten werden. Ebenso tragen die wichtigen Voruntersuchungen, wie das Minimieren von Verzerrungen durch verschiedene Hintergrundsignale und Störgrößen, zu einem besseren Verständnis der physiko-chemischen Randbedingungen bei. Inzwischen wird die ESR-Methode häufig in unserer Arbeitsgruppe und von verschiedenen weiteren Anwendern benutzt.

Die Stärken der ESR unter Verwendung von Spinproben konnten herausgearbeitet und bestätigt werden. In dieser Arbeit ist es gelungen, die Kinetik der Radikalproduktion an Monozyten genau zu beschreiben. Die hier herausgearbeiteten deutlichen Unterschiede in den Superoxidbildungsraten zwischen den Monozyten einer Zelllinie und den frisch aus Blut isolierten Monozyten zeigen, dass für zukünftige Untersuchungen bei Aussagen über Reaktionskinetik streng zwischen den Zellarten unterschieden werden muss.

Über die reine Quantifizierung und das Beschreiben der Kinetik hinaus ist es gelungen erstmals nur mit Hilfe der ESR dezidierte Einblicke in die Signaltransduktion und insbesondere in die Rolle des SOCE für die Superoxidproduktion der NOX-2 in Monozyten zu gelangen. Dies zeigt, dass die ESR vielfältig einsetzbar ist und nicht nur der reinen Quantifizierung dienen kann.

Hier erarbeitete Grundlagen können für weitere ESR-Untersuchungen genutzt werden, welche die Kinetik und Signaltransduktion der Superoxidproduktion mit rein physiologischen Stimulantien wie verschiedenen Bakterien und Toxinen untersuchen.

Ebenso bietet das Messprotokoll die Möglichkeit, Monozyten und weitere Zelltypen nach noch gezielteren Fragestellungen zu untersuchen.

Denkbar ist zum Beispiel die Evaluation verschiedener auch pharmakologisch-therapeutisch relevanter NOX-Inhibitoren [20] mittels ESR an relevanten immunologischen Zellen.

Auch die gleichzeitige Messung des Sauerstoffverbrauchs in der Messlösung und das Verwenden neuer Sauerstoff-durchlässiger Messkapillaren bei, während der Messungen, konstantem Sauerstoffpartialdruck bieten interessante Möglichkeiten. So wird zum Beispiel eine zu frühe Sättigung durch Verbrauch des gelösten Sauerstoffs verhindert, und es können Zellen bei niedrigeren physiologischen Sauerstoffpartialdrücken im Gewebe untersucht werden. Nicht zuletzt bietet auch die ESR, ähnlich wie auf der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) basierende Ansätze mit Hydroethidin [52,92], dank verschiedener geeigneter Spinproben die Möglichkeit, gezielte Aussagen über die Entstehung von Superoxidradikalen zu machen und diese Zellkompartimenten zuzuordnen.

Kapitel 6 Literaturverzeichnis

1. Alonso MT, Manjarrés IM, García-Sancho J (2012) Privileged coupling between Ca²⁺ entry through plasma membrane store-operated Ca²⁺ channels and the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *Mol Cell Endocrinol* 353:37–44
2. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol* 27:669–692
3. Azzi A, Montecucco C, Richter C (1975) The use of acetylated ferricytochrome C for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 65:597–603
4. Bannister J V., Bellavite P, Serra MC, Thornalley PJ, Rossi F (1982) An EPR study of the production of superoxide radicals by neutrophil NADPH oxidase. *FEBS Lett* 145:323–326
5. Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313
6. Bellomo R, Bailey M, Eastwood GM, Nichol A, Pilcher D, Hart GK, Reade MC, Egi M, Cooper DJ (2011) Arterial hyperoxia and in-hospital mortality after resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care* 15:R90
7. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* 395:645–648
8. Bogeski I, Kappl R, Kummerow C, Gulaboski R, Hoth M, Niemeyer BA (2011) Redox regulation of calcium ion channels: Chemical and physiological aspects. *Cell Calcium* 50:407–423
9. Bosshart H, Heinzelmann M (2004) Lipopolysaccharide-mediated cell activation without rapid mobilization of cytosolic free calcium. *Mol Immunol* 41:1023–1028
10. Bosshart H, Heinzelmann M (2016) THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med* 4:438–438
11. Bourdon E, Blache D (2001) The Importance of Proteins in Defense Against Oxidation. *Antioxid Redox Signal* 3:293–311
12. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K (2010) NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 49:687–706
13. Brécharde S, Plançon S, Melchior C, Tschirhart EJ (2009) STIM1 but not STIM2 is an essential regulator of Ca²⁺ influx-mediated NADPH oxidase activity in neutrophil-like HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* 78:504–513

14. Brécharde S, Plançon S, Tschirhart EJ (2013) New Insights into the Regulation of Neutrophil NADPH Oxidase Activity in the Phagosome: A Focus on the Role of Lipid and Ca²⁺ Signaling. *Antioxid Redox Signal* 18:661–676
15. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, Jung M, Namgaladze D, Schmid T, von Knethen A, Weigert A (2013) Redox Control of Inflammation in Macrophages. *Antioxid Redox Signal* 19:595–637
16. Cathcart MK (2004) Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:23–28
17. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM (2006) NADPH Oxidases in Cardiovascular Health and Disease. *Antioxid Redox Signal* 8:691–728
18. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ (2014) THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 23:37–45
19. Chiarugi P (2005) Review PTPs versus PTKs: The redox side of the coin. *Free Radic Res* 39:353–364
20. Cifuentes-Pagano E, Meijles DN, Pagano PJ (2014) The Quest for Selective Nox Inhibitors and Therapeutics: Challenges, Triumphs and Pitfalls. *Antioxid Redox Signal* 20:2741–2754
21. Clapham DE (2007) Calcium Signaling. *Cell* 131:1047–1058
22. Cross AR, Segal AW (2004) The NADPH oxidase of professional phagocytes - Prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1657:1–22
23. Dale DC, Boxer L, Liles WC (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112:935–945
24. Datla SR, Griendling KK (2010) Reactive Oxygen Species, NADPH Oxidases, and Hypertension. *Hypertension* 56:325–330
25. Deschacht M, Horemans T, Martinet W, Bult H, Maes L, Cos P (2010) Comparative EPR study of different macrophage types stimulated for superoxide and nitric oxide production. *Free Radic Res* 44:763–772
26. Dikalov S, Jiang J, Mason RP (2005) Characterization of the high-resolution ESR spectra of superoxide radical adducts of 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N -oxide (DEPMPO) and 5,5-dimethyl-1-pyrroline N -oxide (DMPO). Analysis of conformational exchange. *Free Radic Res* 39:825–836

27. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007) Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49:717–727
28. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG (2007) Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension* 49:717–727
29. Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS, Zafari AM (2007) Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: Comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol* 73:972–980
30. Dikalov SI, Kirilyuk IA, Voinov M, Grigor'Ev IA (2011) EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free Radic Res* 45:417–430
31. Dikalov SI, Harrison DG (2014) Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal* 20:372–382
32. Dikalov SI, Polienko YF, Kirilyuk I (2018) Electron Paramagnetic Resonance Measurements of Reactive Oxygen Species by Cyclic Hydroxylamine Spin Probes. *Antioxid Redox Signal* 28:1433–1443
33. Dikalova a E, Kadiiska MB, Mason RP (2001) An in vivo ESR spin-trapping study: Free radical generation in rats from formate intoxication-- role of the Fenton reaction. *Proc Natl Acad Sci* 98:13549–13553
34. Dröge W (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 82:47–95
35. El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Marie J-C, Braut-Boucher F (2009) p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med* 41:217
36. Freeman BA, Topolosky MK, Crapo JD (1982) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung homogenates. *Arch Biochem Biophys* 216:477–484
37. Galkina E, Ley K (2009) Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 27:165–197
38. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010) Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* (80-) 327:656–661
39. Gerson F (1995) J. A. Weil, J. R. Bolton J. E. Wertz. *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and applications*. Wiley-interscience, New York (1994). Wiley-Blackwell
40. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953–964

41. Green TR, Pratt KL (1987) A reassessment of the product specificity of the NADPH:O₂ oxidoreductase of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 142:213–220
42. Groitl B, Jakob U (2014) Thiol-based redox switches. *Biochim Biophys Acta - Proteomics* 1844:1335–1343
43. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W-J, Demaurex N, Woodside M, Tsai O, Grinstein S (1997) Regulation of Phagosomal Acidification. *J Biol Chem* 272:29810–29820
44. Han JY, Hong JT, Oh KW (2010) In vivo electron spin resonance: An effective new tool for reactive oxygen species/reactive nitrogen species measurement. *Arch Pharm Res* 33:1293–1299
45. Harten JM, Anderson KJ, Kinsella J, Higgins MJ (2005) Normobaric hyperoxia reduces cardiac index in patients after coronary artery bypass surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 19:173–175
46. Hawkins CL, Davies MJ (2014) Detection and characterisation of radicals in biological materials using EPR methodology. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1840:708–721
47. Hogan PG, Lewis RS, Rao A (2010) Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28:491–533
48. Hu Z-D, Wei T-T, Tang Q-Q, Ma N, Wang L-L, Qin B-D, Yin J-R, Zhou L, Zhong R-Q (2016) Gene expression profile of THP-1 cells treated with heat-killed *Candida albicans*. *Ann Transl Med* 4:170–170
49. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ (2011) Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 32:470–477
50. Janzen EG (1971) Spin trapping. *Acc Chem Res* 4:31–40
51. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* 52:1–6
52. Kalyanaraman B, Dranka BP, Hardy M, Michalski R, Zielonka J (2014) HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes - The ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1840:739–744
53. Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J (2005) The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67 phox and Rac-2. *FASEB J* 19:467–469

54. Kettle AJ, Carr AC, Winterbourn CC (1994) Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Med* 17:161–164
55. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, Uzel G, DeRavin SS, Priel DAL, Soule BP, Zarembek KA, Malech HL, Holland SM, Gallin JI (2010) Residual NADPH Oxidase and Survival in Chronic Granulomatous Disease. *N Engl J Med* 363:2600–2610
56. Kuznetsov A V., Kehrer I, Kozlov A V., Haller M, Redl H, Hermann M, Grimm M, Troppmair J (2011) Mitochondrial ROS production under cellular stress: Comparison of different detection methods. *Anal Bioanal Chem* 400:2383–2390
57. Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181–189
58. Lehmeyer JE, Snyderman R, Johnston Jr. RB (1979) Stimulation of neutrophil oxidative metabolism by chemotactic peptides: Influence of calcium ion concentration and cytochalasin B and comparison with stimulation by phorbol myristate acetate. *Blood* 54:35–45
59. Lepe-Zuniga JL, Zigler JS, Gery I (1987) Toxicity of light-exposed Hepes media. *J Immunol Methods* 103:145
60. Liochev SI, Fridovich I (1997) Lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a Mediator of Superoxide Anion Production. *Arch Biochem Biophys* 337:115–120
61. Liochev SI, Fridovich I (1998) Lucigenin as mediator of superoxide production: revisited. *Free Radic Biol Med* 25:926–928
62. Liou G-Y, Storz P (2010) Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 44:479–496
63. Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S (1990) Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. *J Biol Chem* 265:21099–107
64. Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266:17067–71
65. Mishin V, Gray JP, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD (2010) Application of the Amplex red/horseradish peroxidase assay to measure hydrogen peroxide generation by recombinant microsomal enzymes. *Free Radic Biol Med* 48:1485–1491

66. Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G, Dogne JM, De Leval X, Kohnen S, Navet R, Sluse F, Hoebeke M, Pirotte B, Lamy M (2004) Effects of COX-2 inhibitors on ROS produced by Chlamydia pneumoniae-primed human promonocytic cells (THP-1). *Biochem Biophys Res Commun* 325:1122–1130
67. Münzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG (2002) Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1761–1768
68. Murphy MP, Holmgren A, Larsson N-G, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC (2011) Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metab* 13:361–366
69. Nordenfelt P, Tapper H (2011) Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 90:271–284
70. Nunes P, Demaurex N (2010) The role of calcium signaling in phagocytosis. *J Leukoc Biol* 88:57–68
71. Nunes P, Cornut D, Bochet V, Hasler U, Oh-Hora M, Waldburger J-M, Demaurex N (2012) STIM1 Juxtaposes ER to Phagosomes, Generating Ca²⁺ Hotspots that Boost Phagocytosis. *Curr Biol* 22:1990–1997
72. Parekh AB, Putney JW (2005) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 85:757–810
73. Partida-Sanchez S, Iribarren P, Moreno-Garcia ME, Gao J-L, Murphy PM, Oppenheimer N, Wang JM, Lund FE (2004) Chemotaxis and Calcium Responses of Phagocytes to Formyl Peptide Receptor Ligands Is Differentially Regulated by Cyclic ADP Ribose. *J Immunol* 172:1896–1906
74. Pasiaka B., Conrad D., Bogeski I., Saul S., Hoth M. KR Simultaneous quantification of superoxide production and oxygen consumption by human monocytes: An Electron Spin Resonance study Abstract number: P200.
75. Pilcher J, Weatherall M, Shirtcliffe P, Bellomo R, Young P, Beasley R (2012) The effect of hyperoxia following cardiac arrest – A systematic review and meta-analysis of animal trials. *Resuscitation* 83:417–422
76. Poole LB, Karplus PA, Claiborne A (2004) Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:325–47
77. Qin Z (2012) The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221:2–11

78. Qu B, Al-Ansary D, Kummerow C, Hoth M, Schwarz EC (2011) ORAI-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell Calcium* 50:261–269
79. Robbins CS, Swirski FK (2010) The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 67:2685–2693
80. ROMEO D, ZABUCCHI G, MIAMI N, ROSSI F (1975) Ion movement across leukocyte plasma membrane and excitation of their metabolism. *Nature* 253:542–544
81. Roos G, Messens J (2011) Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med* 51:314–326
82. Saul S (2014) Ca²⁺ and reactive oxygen species as determinants of immune and skin cell function - A central role for Orai- and STIM-mediated store-operated calcium entry.
83. Saul S, Gibhardt CS, Schmidt B, Lis A, Pasięka B, Conrad D, Jung P, Gaupp R, Wönnenberg B, Diler E, Stanisiz H, Vogt T, Schwarz EC, Bischoff M, Herrmann M, Tschernig T, Kappl R, Rieger H, Niemeyer BA, Bogeski I (2016) A calcium-redox feedback loop controls human monocyte immune responses: The role of ORAI Ca²⁺ channels. *Sci Signal* 9:1–14
84. Schell-Frederick E (1974) Stimulation of the oxidative metabolism of polymorphonuclear leucocytes by the calcium ionophore A23187. *FEBS Lett* 48:37–40
85. Schieber M, Chandel NS (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol* 24:R453–R462
86. Schulz E, Gori T, Münzel T (2011) Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 34:665–673
87. Serbina N V., Jia T, Hohl TM, Pamer EG (2008) Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol* 26:421–452
88. Sha'afi RI, White JR, Molski TFP, Shefcyk J, Volpi M, Naccache PH, Feinstein MB (1983) Phorbol 12-myristate 13-acetate activates rabbit neutrophils without an apparent rise in the level of intracellular free calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 114:638–645
89. Shi C, Pamer EG (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11:762–774
90. Sies H (1989) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Von H.-J. Galla unter Mitarbeit von H.-J. Müller. Thieme, Stuttgart 1988. Wiley-Blackwell

91. Steinckwich N, Schenten V, Melchior C, Brechard S, Tschirhart EJ (2011) An Essential Role of STIM1, Orai1, and S100A8-A9 Proteins for Ca²⁺ Signaling and Fc R-Mediated Phagosomal Oxidative Activity. *J Immunol* 186:2182–2191
92. Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Nishimatsu H, Nakagawa T, Fushimi K, Kattan MW, Homma Y (2014) Comparison of perioperative outcomes including severe bladder injury between monopolar and bipolar transurethral resection of bladder tumors: a population based comparison. *J Urol* 192:1355–9
93. Tada M, Ichiishi E, Saito R, Emoto N, Niwano Y, Kohno M (2009) Myristic Acid, A Side Chain of Phorbol Myristate Acetate (PMA), Can Activate Human Polymorphonuclear Leukocytes to Produce Oxygen Radicals More Potently than PMA. *J Clin Biochem Nutr* 45:309–314
94. Tallone T, Turconi G, Soldati G, Pedrazzini G, Moccetti T, Vassalli G (2011) Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J Cardiovasc Transl Res* 4:211–9
95. Tavakoli S, Asmis R (2012) Reactive Oxygen Species and Thiol Redox Signaling in the Macrophage Biology of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 17:1785–1795
96. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR-D, Huang P (2008) Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid Redox Signal* 10:1343–1374
97. Trujillo JA, Croft NP, Dudek NL, Channappanavar R, Theodossis A, Webb AI, Dunstone MA, Illing PT, Butler NS, Fett C, Tscharke DC, Rossjohn J, Perlman S, Purcell AW (2014) The Cellular Redox Environment Alters Antigen Presentation. *J Biol Chem* 289:27979–27991
98. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171–176
99. van der Veen BS, de Winther MPJ, Heeringa P (2009) Myeloperoxidase: Molecular Mechanisms of Action and Their Relevance to Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal* 11:2899–2937
100. Vignais P V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59:1428–1459
101. Votyakova T V., Reynolds IJ (2004) Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch Biochem Biophys* 431:138–144

102. WARDMAN P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43:995–1022
103. Waris G, Ahsan H (2006) Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 5:14
104. Weidenbusch M, Anders H-J (2012) Tissue Microenvironments Define and Get Reinforced by Macrophage Phenotypes in Homeostasis or during Inflammation, Repair and Fibrosis. *J Innate Immun* 4:463–477
105. Weissmann N, Kuzkaya N, Fuchs B, Tiyerili V, Schäfer RU, Schütte H, Ghofrani HA, Schermuly RT, Schudt C, Sydykov A, Egemnazarow B, Seeger W, Grimminger F (2005) Detection of reactive oxygen species in isolated, perfused lungs by electron spin resonance spectroscopy. *Respir Res* 6:86
106. Winterbourn CC, Hampton MB, Livesey JH, Kettle AJ (2006) Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome. *J Biol Chem* 281:39860–39869
107. Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 4:278–286
108. Winterbourn CC, Kettle AJ (2013) Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. *Antioxid Redox Signal* 18:642–660
109. Winterbourn CC (2014) The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1840:730–738
110. Wolfson M, McPhail LC, Nasrallah VN, Snyderman R (1985) Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *J Immunol* 135:2057–62
111. Zhang H, Clemens RA, Liu F, Hu Y, Baba Y, Theodore P, Kurosaki T, Lowell CA (2014) STIM1 calcium sensor is required for activation of the phagocyte oxidase during inflammation and host defense. *Blood* 123:2238–49
112. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74–e80
113. Zigler JS, Lepe-Zuniga JL, Vistica B, Gery I (1985) Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed hepes-containing culture medium. *Vitr Cell Dev Biol* 21:282–287

Kapitel 7 Publikationen und Danksagungen

7.1 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Saul S, C. Gibhardt S, Schmidt B, Lis A, Pasieka B, Conrad D, Jung P, Gaupp R, Wonnenberg B, Diler E, Stanisiz H, Vogt T, Schwarz E C, Bischoff M, Herrmann M, Tschernig T, Kappl R, Rieger H, Niemeyer B A, Bogeski (2016)

A calcium- redox feedback loop controls human monocyte immune responses: The role of ORAI Ca²⁺ channels. *Sci. Signal.* 9:1-14

Außerdem gingen folgende Kongressbeiträge und Poster aus dieser Arbeit hervor:

Bastian Pasieka, David Conrad, Ivan Bogeski, Stephanie Saul, Markus Hoth, Reinhard Kappl: **Simultaneous Quantification of Superoxide Production and Oxygen Consumption by Human Monocytes: an Electron Spin Resonance Study**, *Acta Physiologica 2011*; Volume 201, Supplement 682 :P200

Stephanie Saul, Bastian Pasieka, David Conrad, Reinhard Kappl, Markus Hoth, Barbara Niemeyer, Ivan Bogeski:

Redox insensitive ORAI3 Ca²⁺ channels regulate Ca²⁺ dependent ROS production in human monocytes. 90th Annual Meeting of the German Physiological Society (DPG 2011)

S. Saul, D. Conrad, B. Pasieka, M. Hoth, R. Kappl, B. Niemeyer, I. Bogeski:

Redox insensitive ORAI3 Ca²⁺ channels maintain Ca²⁺ dependent ROS production in human monocytes. 26. Ernst Klenk Symposium in Molecular Medicine, NOX Family NADPH Oxidases as Therapeutic Targets, 04.-06.11.2010 in Köln

B. Pasieka, N. Bui, D. Conrad, I. Bogeski, M. Hoth, R. Kappl:

A “physiological” ST/EPR study: activation and superoxide radical production of NADPH-Oxidase in human monocytes. The 45th Annual International Meeting of the ESR Spectroscopy Group of the Royal Society of Chemistry, March 2012 Manchester

7.2 Danksagungen

Hier möchte ich mich nun bei all den Menschen bedanken, ohne deren fortwährende Unterstützung ein Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Markus Hoth für das Vertrauen und das Überlassen des Themas bedanken. Die Zeit in Ihrem Institut hat mir Einblick in die Arbeit hochrangiger Wissenschaftler und Themen gegeben, die ich nie vergessen werde.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Reinhard Kappl kann ich gar nicht genug danken. Die Ruhe und Deine nicht zu erschütternde Zuversicht, mit der du meine Arbeit betreut hast, sind beispiellos. Ohne Deine fachliche und menschliche Größe wäre diese Promotion unmöglich gewesen. Für das Lehren der Methodik und der grundlegenden Arbeitsweisen in der experimentellen Forschung bedanke ich mich ganz herzlich.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ivan Bogeski. Die Hilfe und fruchtbaren Diskussionen, mit denen du meine Arbeit bereichert hast, waren eine große Stütze. Du hast mir geholfen das wissenschaftliche Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Allen Mitarbeitern der Biophysik, die mir geholfen haben mich in der neuen Welt der Labore und Wissenschaft zurechtzufinden und stetig Hilfestellungen gegeben haben ein großes Dankeschön. Das gute Arbeitsklima und die gegenseitige Unterstützung sind beispiellos.

Abschließend möchte ich meiner Familie, all meinen Freunden und lieben Kollegen danken, die mich kontinuierlich bestärkt haben nicht ständig nur zu zweifeln, sondern endlich zu promovieren. Ohne euren Rückhalt hätte ich diese Arbeit wohl nie abschließen können.

Das Vertrauen in mich und eure Geduld mit mir machen mich sprachlos. Besonders die grenzenlose Unterstützung meiner Ehefrau Judit und meine Tochter Sophie waren mein großer Rückhalt. Ohne euch beide im Besonderen wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Hierfür kann ich nicht genug danken.