

FORSCHUNGSBERICHT AUS DER WEHRMEDIZIN

FBWM

DISTRIBUTION STATEMENT A
Approved for Public Release
Distribution Unlimited

Diagnose und Therapie von Funktionsstörungen menschlicher Leukozyten nach Bestrahlung

BEST AVAILABLE COPY

20041110 063

Schutzgebühr: 80 DM

Dieses Heft enthält einen Bericht über eine vom Bundesministerium der Verteidigung - In San I geförderte Arbeit. Verantwortlich für den Inhalt dieses Berichts ist der Vertragsnehmer. Das Bundesministerium der Verteidigung - In San I übernimmt keine Gewähr insbesondere für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie der Beachtung privater Rechte Dritter.

Als Manuskript gedruckt

Druck und Verteilung
im Auftrag des Bundesministeriums der Verteidigung

Streitkräfteamt / Abteilung III
Fachinformationszentrum der Bundeswehr (FIZBw)
Friedrich-Ebert-Allee 34, 53113 Bonn

Telefon: 02 28 / 9 47 - 13 75 (Postnetz) oder 34 30 - 13 75 (Bw-Fernwahl)

Telefax: 02 28 / 9 47 - 13 85 (Postnetz) oder 34 30 - 13 85 (Bw-Fernwahl)

E-mail: fizbw@t-online.de

1999

Berichtsblatt

Dieses Berichtsblatt wird **unabhängig vom Geheimhaltungsgrad** des Gesamtberichtes **immer** als "offen" behandelt

Geheimhaltungswürdige Angaben sind daher nicht in dieses Berichtsblatt aufzunehmen.

1 BerichtsNrAG InSan I - 11Z1-S389197		2 BerichtsNrAN		3 DOKZENTBw LfdN FW 0190			
5 Titel/Untertitel DIAGNOSE UND THERAPIE VON FUNKTIONSTÖRUNGEN MENSCHLICHER LEUKOZYTEN NACH BESTRAHLUNG Abschlußbericht zum Forschungsvorhaben BMVg - InSan I - 11Z1-S-389197				4 Geheimhaltungsgrad offen			
				9 Auftragserteilung (Datum) 12.10.1990			
				10 Abschlußdatum 31.12.1997			
				11 Veröffentlichungsdatum 31.08.1998			
				12 Berichtsart Abschlußbericht			
6 Autor (en) Priv.-Doz. Dr. W. Kaffenberger, RDir Prof. Dr. D. van Beuningen, OTA				13 Vertrags-/AuftragsNr. AN			
7 Auftragnehmer (AN) Priv.-Doz. Dr. W. Kaffenberger, RDir Prof. Dr. D. van Beuningen, OTA				14 Projektbezeichnung/Programm			
8 Auftraggeber (AG) BMVg - InSan I 1				15 Vertrags-/AuftragsNr. AG BMVg - InSan I - 11Z1-S-389197			
24 Kurzreferat Infektionen tragen entscheidend zum hämatopoetischen Syndrom der akuten Strahlenkrankheit bei. Die pathophysiologischen Ursachen der zugrunde liegenden Immundefekte sind zahlenmäßige und/oder funktionelle Schädigungen des weißen Blutbildes. Den neutrophilen Granulozyten (PMN) kommt eine große Bedeutung als vorderste Front der immunologischen Abwehr zu, die von den charakteristischen Funktionen für Phagozyten, Phagozytose und „respiratory burst“, getragen wird. Der Phagozytoseprozeß führt zur Aktivierung des membranständigen Enzyms NADPH-Oxidase, das Superoxidanionen als Ausgangsprodukte für eine Reihe weiterer Sauerstoffradikale bereitstellt. In Verbindung mit proteolytischen Enzymen der PMN-Granula wirken die Sauerstoffradikale zytotoxisch auf die phagozytierten Keime. Die intrazellulären Signalübertragungsprozesse zur Aktivierung der NADPH-Oxidase sind Gegenstand der vorliegenden Untersuchung an bestrahlten PMN des Menschen und an einem PMN-Modell: HL-60 Promyelozyten, die mit Dimethylsulfoxid zur Differenzierung zu Neutrophilen-ähnlichen induziert wurden. Behandlung der Zellen mit löslichen Rezeptor-abhängigen oder -unabhängigen Stimuli (Chemotaxin und Immunkomplexe bzw. Phorbol ester) aktiviert die NADPH-Oxidase auf parallel verlaufenden Signaltransduktionskaskaden, die in einer Aktivierung von Proteinkinase C-Isoenzymen zusammenlaufen. Einzelne Enzyme der Kaskaden wurden mittels pharmakologischer Inhibitoren in Verbindung mit dem „Western“-Verfahren identifiziert, Lipid- ² nd-messenger durch HPLC-Analyse. Die Daten weisen auf ein äußerst komplexes System mit Quervernetzungen, Rückkopplungen und Parallelschaltungen bei der Aktivierung der NADPH-Oxidase hin. Sie identifizieren erstmals mehrere zytoplasmatische/membranständige Elemente von Signaltransduktionskaskaden als strahlenempfindlich, die eine mögliche Basis für kausal-orientierte Therapieansätze und eine Erklärung für Immundefekte nach Bestrahlung bieten.				17 Gesamtseitenzahl - 175 -		18 Quellen - 496 -	
				19 Tabellen - 2 -		20 Statistiken - - -	
				21 Techn.Zeichnungen - - -		22 Abbildungen - 49 -	
				23 Zusätzliche Angaben/Hinweise			
				25 Schlagwörter Strahlenschaden; Immundefekt; neutrophile Granulozyten; HL-60 Zellen als „Modell-Granulozyten“; „respiratory burst“-Funktion; intrazelluläre Signalübertragung; neue Targets für ionisierende Strahlung		26 Sperrvermerk (Text)	

(Der umseitige Vordruck ist so konzipiert, daß er sowohl für VS-Dokumente, als auch für sämtliche Arten von Berichten aus Bw-Aufträgen/Verträgen benutzt werden kann. Es kann also durchaus vorkommen, daß für Felder keine Angaben vorhanden sind und diese somit frei bleiben.)

Ausfüllanweisung zum Berichts-/Erschließungsblatt

FeldNr

- 1 = **LfdNr**
Wird von DOKFIZBw ausgefüllt
- 2 = **BerichtsNr des Herausgebers/Auftragnehmers (AN)**
Vom Herausgeber oder Auftragnehmer (AN) dem von ihm erstellten Bericht zugeteilte(n) Identifikationskennzeichen, unter Voransetzen des Akronymes bzw. der Kurzbezeichnung des Herausgebers/Auftragnehmers (AN).
- 3 = **BerichtsNr des Auftraggebers (AG)**
Vom Auftraggeber (AG) dem Bericht zugeteilte(n) Identifikationskennzeichen, unter Voransetzen des Akronymes bzw. Kurzbezeichnung des AG (z.B. BMVg FBWT-10-92)
- 4 = **Titel/Untertitel**
Originalsachtitel des Dokumentes/Berichtes und ggf. der zugehörige Untertitel. Bei mehrbändigen Berichten ist die Bandzählung des betreffenden Berichtes sowie ggf. der zugehörige Einzeltitel anzugeben; (vgl. auch Feld 27)
Kurztitel: Es ist nur der Kurztitel des Vorhabens mit maximal 30 Stellen einzutragen.
- 4 a = **Ins Englische übersetzter Titel/Untertitel**
Der deutschsprachige Originalsachtitel des Dokumentes/Berichtes und ggf. der Untertitel sind ins Englische zu übersetzen, wenn möglich, vom Autor!
- 5 = **Autor(en)**
Der/Die Name(n) des/der Verfasser(s) bzw. Bearbeiter(s) des Dokumentes/Berichtes in der Reihenfolge: Name, Vorname(n). Ist oder soll kein persönlicher Verfasser/Bearbeiter genannt (werden), so ist der Name der Institution einzutragen, die der körperschaftliche Urheber ist.
- 6 = **Auftragnehmer (AN)**
Offizielle Benennung der Institution(en), ggf. mit Angabe der Abteilung, die als Auftragnehmer bzw als Sub- oder Mitauftragnehmer an der Erstellung des Berichtes beteiligt waren, in der Reihenfolge: Benennung, Ort/Sitz, Landangabe.
- 7 = **Auftraggeber (AG) / Aufgabensteller (AST) / Fachlich zuständige Stelle**
Die Benennungen der vertragschließenden, d.h., der auftragerteilenden und aufgabenstellenden bzw. fachlich zuständigen Referate des BMVg oder BWB und sonstiger Ämter der Bw, sind einzutragen.
- 8 = **Kurzreferat**
Das Kurzreferat ist eine Form der Inhaltsbeschreibung und soll die wesentlichen Sachverhalte und/oder Ergebnisse des Dokumentes so darstellen, daß der Leser objektiv in die Lage versetzt wird zu entscheiden, ob das Dokument für seine Zwecke relevant ist.
- 9 = **Schlagwörter**
Schlagwörter sind eine andere Form der Inhaltsbeschreibung. Sie sollen in prägnanter Weise in Form von Wörtern und/oder Wortzusammensetzungen schwerpunktartig den Inhalt des Dokumentes kennzeichnen. Anzugeben sind ein bis zehn Schlagwörter.
- 10 = **Dienststelle (DSt) und Standort (StO) (Dokument langfristig verfügbar, Ausleihe)**
Trifft nur zu für Dokumente mit Geheimhaltungsgrad VS-VERTRAULICH oder GEHEIM (vgl. BMVg, FÜ S I 4 – Az 52-60-60 vom 01.07.1986). Es ist die Dienststelle der Bw, möglichst mit Abt/UA und TgbNr, anzugeben, bei der das Dokument langfristig zur Ausleihe verfügbar ist. Der StO erhält von DOKFIZBw eine Mitteilung über die vergebene DOKFIZBw-lfd-Nr und später auch nach o.a. Erlaß die Anträge auf Lieferung des betreffenden Dokumentes zugesandt.
- 11 = **Geheimhaltungsgrad**
Geheimhaltungsgrad des Dokumentes ist entsprechend anzukreuzen.
- 12 = **Gesamtseiten-/blattzahl**
Hier ist die Gesamtzahl der Seiten anzugeben – Bei VS die Blattzahl.
- 13–17 = **Quellen, Tabellen, Statistiken, Techn. Zeichnungen, Abbildungen**
Es ist jeweils die Anzahl der in dem Dokument aufgeführten/enthaltenen Angaben/Beigaben einzutragen.
- 18 = **Berichtsdatum**
Das Datum des Dokumentes/Berichtes (ersichtlich aus Deck-/Vorblatt oder Titelei). Fehlende Angaben zu Monat oder Tag sind mit Nullen aufzufüllen.
- 19 = **Berichtsart**
Z.B.: Zwischenbericht (1–n), Abschlußbericht, Konferenzbericht.
- 20 = **Auftrags-/VertragsNr des AG**
Vom AG dem Auftrag zugeteilte(n) Identifikationskennzeichen. Es sind alle Auftrags-/VertragsNr der Aufträge/Verträge anzugeben, aufgrund deren der Bericht erstellt wurde.
- 21 = **Auftragserteilung/Vertragsabschluß**
Datum der Auftragserteilung bzw des Vertragsabschlusses.
- 22 = **Abschlußdatum/Vertragsende**
Datum an dem der Auftrag/Vertrag beendet/abgelaufen ist.
- 23 = **Projekt-/Programm-/Konzeptbezeichnung**
Offizielle Bezeichnung des Projektes bzw. Name des Programms.
- 24 = **Studien-/Aufgabenkennziffer, DateiblattNr**
Die für den Bericht zutreffende, von AG oder AST vergebene Studien-/Aufgabenkennziffer und/oder DateiblattNr.
- 25 = **Aktenzeichen des AG/Herausgebers oder der fachlich zuständigen Stelle**
Eintrag unter Voransetzen des Akronymes bzw. Kurzbezeichnung.
- 26 = **Sperrvermerk**
Nur der vom AG/AST bzw. der fachlich zuständigen Stelle im BMVg, BWB oder anderen Ämtern der Bw dem Dokument zugeteilte Sperrvermerk. (Andere Sperrvermerke werden vom DOKFIZBw in solche der Bw umgesetzt.)
- 27 = **Zusätzliche Angaben/Hinweise**
Angaben zu Konferenzbericht (Veranstalter, Titel, Ort, Datum), sowie Umfang und Art von Anlagen und Hinweise auf andere Dokumente/Berichte die mit dem Dokument/Bericht in sachlichem Zusammenhang stehen.

Forschungsbericht aus der Wehrmedizin

DIAGNOSE UND THERAPIE VON FUNKTIONSTÖRUNGEN MENSCHLICHER LEUKOZYTEN NACH BESTRAHLUNG

Auftraggeber:

Bundesminister der Verteidigung - InSan I

Vertragnehmer:

Prof. Dr. D. van Beuningen, OTA
Priv.-Doz. Dr. W. Kaffenberger, RDir
Sanitätsakademie der Bundeswehr
München

Bearbeiter:

Priv.-Doz. Dr. W. Kaffenberger, RDir
C. Baaske, MTA
D. Leipert, SU
Prof. Dr. D. van Beuningen, OTA

Manuskript: August 1998

Titel englisch:

„Diagnosis and therapy of dysfunctions of
human leukocytes after irradiation“

AQ F05-a-0116

Kurzfassung

Ein wesentlicher Aspekt des hämatopoetischen Syndroms der akuten Strahlenkrankheit sind Infektionen. Die pathophysiologischen Ursachen ihrer Entstehung sind zahlenmäßige und/oder funktionelle Schädigungen des weißen Blutbildes als bedeutende Komponente des zellulären Immunsystems. Den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) kommt dabei eine besonders große Bedeutung als vorderste Front der Immunabwehr zu. Nach Adhärenz an und Diapedese durch die Endothelwandung der Gefäße müssen sie chemotaktisch angelockt auf einen Infektionsherd zuwandern und nach der Phagozytose der Erreger den sog. „respiratory burst“ auslösen. Es handelt sich hierbei um die „killing“-Funktion der PMN, die durch eine starke Produktion reaktiver Sauerstoffradikale in Verbindung mit proteolytischen Enzymen der Granula ein potentes „Desinfektionsgemisch“ herstellt, das zytostatisch und -toxisch auf die phagozytierten Keime wirkt. Ausgangsprodukt aller Sauerstoffradikale sind Superoxidanionen, die vom Enzymkomplex der NADPH- (oder „respiratory burst“-)-Oxidase durch Transfer von Elektronen des NADPH auf molekularen Sauerstoff bereitgestellt werden. Die molekularen Mechanismen der Aktivierung der NADPH-Oxidase waren am Beginn der Untersuchungen nur ansatzweise verstanden; über mögliche Strahleneffekte auf die Aktivierungsprozesse (intrazelluläre Signalübertragung) lagen keine Daten vor.

Die Experimente wurden an isolierten humanen PMN sowie an der Promyelozyten-Zelllinie HL-60 vorgenommen, die durch Behandlung mit Dimethylsulfoxid zur granulozytären Differenzierung induziert wurde. Der „respiratory burst“ wurde durch lösliche Stimuli (Chemotaxin: formyliertes Tripeptid, f-MLP, oder Immunkomplexe oder Phorbol ester) ausgelöst und durchflußzytometrisch oder luminometrisch mit den Indikatormolekülen Dihydrorhodamin 123 bzw. „Luminol“ gemessen. Postulierte Enzyme der Signalübertragung wurden im „Western blot“-Verfahren nachgewiesen und pharmakologisch inhibiert, der Lipid- 2^{nd} -messenger Diacylglycerol (DAG) wurde mittels HPLC-Analyse quantifiziert.

Die Daten identifizieren Proteinkinase (PK) C-Aktivität als zentrales Element der Signaltransduktion zur Aktivierung der NADPH-Oxidase. Mehrere Phospholipasen (β , γ), Protein-Tyrosin- sowie -Serin/Threonin-Kinasen und -Phosphatasen sind bei der Signalweiterleitung beteiligt ebenso wie DAG-Kinasen und Phosphatidyl-Phosphohydrolasen. Neben PKC-Aktivität konnten erstmals weitere zytoplasmatische/membranständige Elemente der Signalübertragung (DAG und DAG-Kinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase) sowie der Fc γ -Rezeptor-vermittelte „respiratory burst“ als strahlenempfindliche „Targets“ (< 5 Gy) identifiziert werden. Die Ergebnisse bieten eine Basis für kausal-orientierte Therapieansätze und eine Erklärung für Immundefizite nach Bestrahlung.

Summary

Infections are an important aspect of the hematopoietic syndrome of acute radiation sickness. Pathophysiologically infections are caused by depletions and/or functional deficiencies of white blood cells as major carriers of cellular immunity. Polymorphonuclear neutrophilic granulocytes (PMN) are important as the first immunological barrier. PMN functions include the adhesion to and diapedesis through the endothelial layer of blood vessels, the chemotactic migration to the area of infection, and the exertion of the so-called respiratory burst after the phagocytotic process. The respiratory burst of phagocytes is the killing function of these cells during which huge amounts of oxygen radicals are being produced. Together with granula-derived proteolytic enzymes oxygen radicals constitute a potent disinfectant solution which acts cytostatically and cytotoxically on phagocytized germs. The chemical basis for all oxygen radicals are superoxide anions produced by the transfer of NADPH-derived electrons onto molecular oxygen by an enzyme complex called NADPH- or respiratory burst oxidase. At the beginning of our study, the molecular mechanisms which activate the NADPH oxidase were only scarcely known. No information was available on the effects of ionizing radiation on intracellular signal transduction processes involved.

Experiments were performed with isolated human PMN and with the promyelocytic HL-60 cell line, induced to differentiate along the granulocytic lineage with dimethyl sulfoxid. The respiratory burst reaction was triggered with soluble stimuli (chemotactic agent: formylated tripeptide, f-MLP, immune complexes, or phorbol ester) and measured flow cytometrically or as chemiluminescence signals with indicator molecules dihydrorhodamine 123 or luminol, respectively. The presence of enzymes was postulated, verified with Western blotting, and their activities were inhibited pharmacologically, lipid 2nd-messengers (diacylglycerol) were measured by HPLC.

Our results identify protein kinase (PK) C activity as the central element of signal transduction cascades involved in the activation of the NADPH oxidase. In addition, several phospholipases (β , γ), protein tyrosine- as well as protein serine/threonine kinases and DAG kinases in combination with phosphatidate phosphohydrolase contribute to intracellular signal transduction processes. For the first time, besides PKC activity new cytoplasmic/membrane-bound elements of signal transduction processes (DAG concentration and DAG kinase activity, phosphatidylinositol 3-kinase activity), and the Fc γ receptor-mediated respiratory burst of PMN were identified as radiosensitive „targets“ for doses < 5 Gy. These results provide a basis for causally-oriented therapeutic approaches and could help to explain immunodeficiencies observed after exposure to ionizing radiation.

Gliederung

	Seite
Inhaltsverzeichnis	IV
Verzeichnis der Abkürzungen	VIII
1. Einleitung	1
1.0 Prolog	1
1.1 Die "respiratory burst"-Funktion der Phagozyten	2
1.1.1 Historie	2
1.1.2 Grundzüge der unspezifischen Immunabwehr	3
1.1.3 Vorkommen und Biochemie der "respiratory burst"-Reaktion	4
1.1.4 Die Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion (intrazelluläre Signalübertragung)	7
1.1.5 Pathophysiologie der "respiratory burst"-Reaktion	13
1.2. Das HL-60 Modell	14
1.3 Strahlenwirkung auf Elemente der intrazellulären Signaltransduktion	16
1.4 Fragestellung	18
2. Material und Methoden	21
2.1 Bezugsquellen für Reagenzien	21
2.1.1 Zusammensetzung der gebräuchlichsten Pufferlösungen:	22
2.1.2 Verzeichnis der eingesetzten Inhibitoren mit Lösungsmitteln und Konzentrationen der Stammlösungen	24
2.2 Zellen	25
2.2.1 Blutzellen	25
2.2.2 HL-60 Zelllinie	25
2.3 Röntgenbestrahlung	26
2.4 Wachstumskurve und Überleben nach Bestrahlung ("Klonierungstest")	26
2.5 Präparation von Granulozyten aus Vollblut	26
2.6 Vitalitätstestung	27
2.7 Funktionelle Untersuchungen	27
2.7.1 Messung der "respiratory burst"-Reaktion	27
2.7.1.1 Durchflußzytometrischer Test	28
2.7.1.2 Chemolumineszenz-Assay	29
2.7.1.3 Nitroblau-Tetrazolium Reduktionstest	29
2.7.1.4 Herstellung von Immunkomplexen	29

	Seite
2.7.2	Phagozytose-Test 30
2.8	Immunphänotypisierung 30
2.8.1	Expression von CD-Antigenen 30
2.8.2	Expression des Formylpeptid-Rezeptors (FPR) 31
2.8.3	Markierung von intrazellulären Phosphotyrosinresten an Proteinen 31
2.8.4	Darstellung des filamentären Actins des Zytoskeletts 32
2.9	Durchflußzytometrie 32
2.10	RNA-Isolierung und "Northern blot" 33
2.11	Immunpräzipitation und "Western blot" von Proteinen 34
2.12	Proteinkinase C (PKC)-Aktivitätsassay 36
2.13	Lipidextraktion 37
2.14	HPLC-Analyse 37
2.15	Biochemisch-fluorometrischer Nachweis von H ₂ O ₂ 38
2.16	Statistik 38
3.	Ergebnisse 39
3.1	Strahlenbiologische, immunphänotypische und funktionelle Charakterisierung des HL-60 Modells 39
3.1.1	Zellproliferation, Differenzierung und Überleben nach Bestrahlung 39
3.1.2	Phänotypische Veränderungen unter Differenzierung und/oder Bestrahlung 41
3.1.3	Funktionelle Reifung unter Differenzierung und/oder Bestrahlung 44
3.1.3.1	Ausstattung von Granulozyten und HL-60 Zellen mit antioxidativen Mechanismen 49
3.1.4	Veränderungen von PKC-Isoenzym-Mustern nach Differenzierung und/oder Bestrahlung 50
3.1.5	Veränderung der PKC-Aktivität unter Differenzierung und/oder Bestrahlung 52
3.1.6	Veränderung des F-Actins des Zytoskeletts unter Differenzierung und Bestrahlung 55
3.2	Signaltransduktionswege zur Auslösung der "respiratory burst"-Aktivität und ihre Strahlensensitivität 59
3.2.1	Allgemeines zu Strahleneffekten 60
3.2.2	"Respiratory burst"-Oxidase 61
3.2.3	Protein Kinase C-Aktivität 63
3.2.3.1	Strahleneffekte auf Reaktionswege mit direkter PKC-Aktivierung durch PMA 65

	Seite
3.2.4	Phospholipasen 66
3.2.4.1	Phospholipasen C 66
3.2.4.1.1	Phosphatidylinositol-abhängige Phospholipase C (PtdIns-PLC) 67
3.2.4.1.2	Phosphatidylcholin-abhängige Phospholipase C (PtdCho-PLC) 68
3.2.4.2	Phospholipase A ₂ 69
3.2.5	Protein-Tyrosin-Kinase- und -Phosphatase-Aktivitäten 70
3.2.5.1	Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität und "respiratory burst" 72
3.2.5.2	Protein-(Tyrosin)-Phosphatase-Aktivität und "respiratory burst" 74
3.2.6	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität und "respiratory burst" 76
3.2.7	PTK- neben PI3-Kinase-Aktivität und "respiratory burst" 81
3.2.8	Diacylglycerin-Kinase/Phosphatidyl-Phosphohydrolase und "respiratory burst" 82
3.3	Strahleneffekte auf Lipidmetabolite als "2 nd messenger" der Signaltransduktion 86
4.	Diskussion 90
4.1	Diskussion des HL-60 Modells 91
4.1.1	Diskussion des Promyelozyten-/Progenitor-Status' der HL-60 Zellen 91
4.1.2	Diskussion der immunphänotypischen Veränderungen induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen 92
4.1.3	Diskussion der funktionellen Veränderungen induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen 95
4.1.4	Diskussion der Veränderungen des Zytoskeletts induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen 96
4.2	Diskussion der Signalübertragung zur Aktivierung des "respiratory burst" 100
4.2.1	Methodische Aspekte 100
4.2.2	Diskussion der verwendeten Stimuli des "respiratory burst" 102
4.2.3	Diskussion der Beteiligung von Elementen der intrazellulären Signalübertragung bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion und ihre Strahlenempfindlichkeit 103
4.2.3.1	PMA- und f-MLP-induzierte Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase 104
4.2.3.1.1	Bedeutung der Proteinkinasen C (Vorkommen von Isoenzymen, Aktivität, Translokation, Strahlenempfindlichkeit) 104
4.2.3.1.2	Bedeutung der PtdIns-Phospholipasen C 108
4.2.3.1.3	Bedeutung der Phospholipase A ₂ und von Arachidonsäure 109
4.2.3.1.4	Bedeutung von Protein-Tyrosinkinasen, -Phosphatasen, Phospholipase D und Phosphatidylinositol 3-Kinase 113

	Seite
4.2.3.1.5	Bedeutung von Phosphatidyl-Phosphohydrolase 119
4.2.3.1.6	Bedeutung von Diacylglycerin-Kinase 120
4.2.3.1.7	Bedeutung von PtdCho-Phospholipase C 121
4.2.3.2	Fcy-Rezeptor-induzierte Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase 122
4.2.3.2.1	Signaltransduktion durch Fcy-Rezeptoren 122
4.2.3.2.2	Bedeutung von Protein-Tyrosinkinasen und Phospholipase A ₂ 124
4.2.3.2.3	Bedeutung von Proteinkinasen C, Phospholipase C und Phosphatidylinositol 3-Kinase 125
4.3	Zusammenfassung der diskutierten Signaltransduktionswege 126
4.4	Diskussion der Strahleneffekte auf die Signalübertragung 128
4.5	Ausblick 132
4.5.1	Phosphatidylinositol 3-Kinase - ein neues Zentrum strahlenbiologischer Forschung? 132
4.5.2	Bedeutung der Kenntnisse über die Strahlenempfindlichkeit PKC für zukünftige Therapieansätze 135
5.	Zusammenfassung 137
6.	Literatur 140

Verzeichnis der Abkürzungen

α PY	anti-Phosphotyrosin-(Antikörper)
AA	Arachidonsäure
AAG	Alkylacylglycerin
AD(M, T)P	Adenosin-Di(Mono, Tri)-Phosphat
ARDS	akutes respiratorisches Distress-Syndrom
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AT	Ataxia teleangiectasia
BSA	bovines Serumalbumin
C(5a)	Komplementfaktor (5a)
CALB	Ca-Lipid-bindende (Proteindomäne)
cDNA	complementäre DNA
CD	"cluster of differentiation"
CGD	"Chronic granulomatous disease"
CL	Chemolumineszenz
CSF	"colony-stimulating factor"
CytB	Cytochalasin B
d(A)TP	Desoxy(Adenosin)Triphosphat
dbc-AMP	Dibutyryl-cyclisches AMP
DAG	Diacylglycerol
DCFH-DA	Dichlorfluorescein-Diacetat
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenylenjodonium-Jodid
DTT	Dithiothreitol
ECL	"enhanced chemiluminescence"
EGF	"epidermal growth factor"
ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
F-Actin	filamentäres Actin
FAD	Flavinadenin-Dinukleotid
Fc	konstantes Fragment der Immunglobuline
FGF	"fibroblast growth factor"
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
f-MLP	formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FPR	Formylpeptid-Rezeptor

G-6-P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	Guanosin-Dissoziations-Inhibitor
GD(T)P	Guanosin-Di(Tri)-Phosphat
G(M)-CSF	Granulozyten (Makrophagen)-Kolonie-stimul. Faktor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HBSS	mit Hanks'-Salzen gepufferte Kochsalzlösung
<i>Hck</i>	"haematopoietic cell protein-tyrosine kinase"
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonic acid
HP	Hexapeptid (formyl-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie
IC ₅₀	50% inhibitorische Konzentration
ICAM	"intracellular adhesion molecule"
Ig(G)	Immunglobulin (G)
IFN	Interferon
IKs	Immunkomplexe
IL	Interleukin
Ins(P ₃)	Inositol(Triphosphat)
ITAM	"immunoreceptor tyrosine-based motif"
kB/kDa	kilo Basen/kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
LTB ₍₄₎	Leukotrien B ₍₄₎
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
m(r)RNA	messenger (ribosomale) RNA
NADPH	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsatz
NF-κB	Nuklearfaktor kappa B
NR-PTK	Nichtrezeptor-Protein-Tyrosin-Kinase
OA	"Okadaic acid"
ox	oxidiert
P	Phosphatrest
PA	Phosphatitsäure (acid)
PAF	"platelet activating factor"
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (saline)
PCNA	"proliferating cell nuclear antigen"
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Phytoerythrin

PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK(C; A)	Proteinkinase (C; A)
PL	Phospholipase
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	polymorphkernige Granulozyten
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPH	Phosphatidyl-Phosphohydrolase
Ptd (Ins, Cho)	Phosphatidyl (Inositol, -Cholin)
PTK	Protein-Tyrosin-Kinase
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
R	Rezeptor
<i>Rac</i>	"related to PKA and PKC"
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Kulturmedium RPMI 1640
RT	Raumtemperatur
SAP	"stress-activated protein"
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
Ser	Serin
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TMS	"transmembrane-spanning" (Form eines Rezeptors)
TNF	Tumornekrosefaktor
UE	Untereinheit (eines Enzymkomplexes)
VE	Volumeneinheit
v/v	Volumen/Volumen
... x g	-fach Erdbeschleunigung
Y	Tyrosin

1. Einleitung

1.0 Prolog

Die DNA des Zellkerns galt bisher als empfindlichstes Target für ionisierende Strahlung. Man nahm an, daß der radiogene Zelltod eine Folge bestimmter nicht reparierbarer DNA-Läsionen ist. Neuere Untersuchungen sprechen jedoch dafür, daß auch bereits relativ niedrige Strahlendosen zytoplasmatische Targets und hier die komplexen Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion beeinflussen.

Für das Überleben und die Funktion der bestrahlten Zelle könnten die Effekte im Zytoplasma eine ähnlich große Bedeutung besitzen wie die an der DNA (Coleman 1993; Weichselbaum et al. 1994). Besonders deutlich wurde dieser Aspekt auf dem "10th International Congress on Radiation Research" im August 1995 in Würzburg. Auch die eigenen Experimente gehen dieser Problematik nach. Sie zeichnen sich dadurch aus, daß nicht wie bei vielen anderen Studien nur die Veränderung eines (molekularbiologischen) Parameters festgestellt wird, sondern daß ein sehr komplexer biologischer Endpunkt untersucht wird, der große Bedeutung für die Zelle und den Gesamtorganismus hat.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht die immunologische Funktion des "respiratory burst" (s. Kap. 1.1) in neutrophilen Granulozyten sowie in differenzierten HL-60 Zellen als Modell für derartige Studien an permanenten Zelllinien (s. Kap. 1.2). Der "respiratory burst" bildet den Endpunkt mehrerer Kaskaden von intrazellulären Signalen. Das experimentelle System wurde gewählt, da an ihm der Einfluß ionisierender Strahlung auf intrazelluläre Signaltransduktion abgelesen und gemessen werden kann.

Hinsichtlich der o.g. "Nicht-DNA"-Targets für ionisierende Strahlen sind mittlerweile höchst interessante experimentelle Modelle beschrieben, in denen erst die strahlen-induzierten Membran- und/oder Zytosoleffekte die nukleären Ereignisse bestimmen, die zur malignen Transformation oder zum Untergang der bestrahlten Zelle, z.B. durch Apoptose, führen (Uckun et al. 1992; Fuks et al. 1995). In diesem Zusammenhang zeigt sich ein zu verallgemeinerndes Prinzip: die beobachteten Effekte werden durch die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (man spricht vom sog. "oxidativen Streß") ausgelöst, die Elemente der intrazellulären Signalübertragung zum Target haben. Die Modulation der Signalübertragung bestimmt somit die zelluläre Reaktion auf ionisierende Strahlung.

Dem Verständnis der intrazellulären Signalübertragung für die normale Physiologie der Zelle und deren mögliche Fehlregulation bei pathologischen Zuständen kommt eine zentrale Bedeutung zu (Lord & Pongracz 1995). Von der Identifizierung geeigneter Targets für die pharmakologische Intervention auf dem Niveau von Elementen der Signalübertragung erwartet man neue, erfolgversprechende Therapieansätze für viele

Erkrankungen (Lord & Pongracz 1995; Uckun et al. 1995). Die therapeutische Modulation einer möglicherweise im Tumor und in anderen pathologisch veränderten Geweben vorhandenen Fehlsteuerung der Signaltransduktion steht daher im Interesse vieler Untersuchungen (Brugge 1993; Grunicke 1995; Powis et al. 1995 und 1995a; Uckun et al. 1995; Rehring et al. 1996). Über die Beeinflussbarkeit der Signaltransduktion durch Strahlung liegen bisher allerdings nur sehr wenige Daten vor. Es muß jedoch angenommen werden, daß entsprechende Reaktionen unter Strahlentherapie sowohl in bösartigen als auch gutartigen, gesunden Geweben eine Rolle spielen.

Oxidativer Stress kann auf vielerlei Art entstehen und die "Radiolyse" des Wassers durch ionisierende Strahlung ist nur ein Mechanismus, über den die Zelle mit reaktiven Sauerstoffverbindungen konfrontiert werden kann. Höher entwickelte Lebewesen, wie Säugtiere, besitzen in den Phagozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) Bestandteile des Immunsystems, die in der Lage sind, große Mengen an Sauerstoffradikalen zu produzieren. Diese Radikale werden physiologischerweise im Zuge einer immunologischen Reaktion gebildet, die - auch im Deutschen - als "oxidative burst" oder "respiratory burst" bezeichnet wird (Babior 1978).

1.1 Die "respiratory burst"-Funktion der Phagozyten

1.1.1 Historie

Anfang der 30er Jahre dieses Jahrhunderts experimentierten Wissenschaftler der "University of Chicago" mit Leukozyten des Hundes und machten dabei die Entdeckung, daß der Phagozytoseprozeß mit einem plötzlich einsetzenden Verbrauch an molekularem Sauerstoff einhergeht (Baldrige & Gerard 1933). Sie führten diesen "main burst of extra respiration", wie sie ihn nannten, und der innerhalb weniger Minuten nach Zugabe der *Sarcina*-Kokken zur Leukozytensuspension im Warburg-Manometer verfolgt werden konnte, auf die Stimulation der Mitochondrien zurück, welche die zusätzliche Energie für die Phagozytose bereitstellen würden. Erst 25 Jahre später stellten Sbarra & Karnovsky (1959) bei der Untersuchung der Phagozytose von Tuberkelbazillen durch neutrophile Granulozyten und Monozyten fest, daß der Sauerstoffverbrauch nicht durch Inhibitoren der Atmungskette wie Zyanidionen beeinflussbar war und also einem anderen Zweck als der Energiegewinnung dienen mußte. Als in den folgenden Jahren gezeigt werden konnte (Holmes et al. 1966 und 1967; Tauber et al. 1983), daß eine genetisch bedingte Erkrankung (Septische Granulomatose; engl.: "chronic granulomatous disease", CGD; Babior & Woodman 1990) mit einer Dysfunktion von Neutrophilen in Form einer fehlenden oder

stark reduzierten Produktion von Sauerstoffradikalen ursächlich verknüpft ist, nahm die Erforschung der "respiratory burst"-Reaktion einen großen Aufschwung.

Das Krankheitsbild der CGD ist gekennzeichnet durch rezidivierende, kaum beherrschbare systemische bakterielle Infektionen und Mykosen (Curnutte 1992 sowie dort zitierte Literatur). Entsprechend verstarben die betroffenen Patienten früher bereits im Kindesalter, erreichen jedoch heute das Erwachsenenalter (Curnutte 1992; Maly & Schürer-Maly 1995). Ihre Infektanfälligkeit kann auf verschiedene, autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbte Defekte zurückgeführt werden (Babior & Woodman 1990), die alle über die Neutrophilendysfunktion massiv die unspezifische Immunabwehr betreffen.

Die klinische Situation ist derjenigen vergleichbar, die nach dem Abfall der Neutrophilen unter ein kritisches Niveau von ca. 500 - 1.000 Zellen/ μ l Blut entsteht, z.B. nach massivem Strahleninsult oder nach Chemotherapie, wobei sich das Risiko für die Entwicklung schwerwiegender und tödlich verlaufender Infektionen umgekehrt proportional zur Neutrophilenzahl verhält (Bodey et al. 1966; Edwards 1994).

1.1.2 Grundzüge der unspezifischen Immunabwehr

Phagozyten bilden die zellulären Elemente der sog. unspezifischen Immunabwehr (Abb. 1). Als mobilste und zahlenmäßig bedeutsame Subpopulation stellen neutrophile Granulozyten (engl. "polymorphonuclear cells", PMN) die vorderste, schnell aktivierbare immunologische Abwehrlinie gegen extrazelluläre pathogene Mikroorganismen (Bakterien und Pilze) dar. Die Neutrophilen sind dafür mit spezifischen Funktionen ausgestattet, die ihnen das Erkennen, aktive Erreichen sowie die Aufnahme und Abtötung der Keime - ihre "raison d'être" (Cohen 1994) - ermöglichen. Ihre Fähigkeit zur Adhärenz erlaubt den Neutrophilen die Anheftung an Endothelzellen der Blutgefäße, als Voraussetzung für das aktive Verlassen der Gefäße und Durchwandern ("Diapedese") der Gefäßwand. Dies geschieht über sog. Adhäsionsmoleküle, die auf den beiden beteiligten Zelltypen vorhanden sind (Roitt et al. 1995). Die Orientierung auf den Infektionsherd zu erfolgt durch chemotaktische Bewegung entlang chemischer Gradienten von Metaboliten des Infektions- und Entzündungsherd.

Die Erkennung der Metabolite geschieht über spezifische "Antennen" ("Rezeptoren") in der Zellmembran, z.B. für ein formyliertes Tripeptid [formyl-Methionyl-Leucyl-Phenyl-alanin (f-MLP)], ein unreifes Peptid (Segal & Abo 1993), das als Bestandteil der Zellwand zerfallender Mikroorganismen (Schiffmann et al. 1975) oder aus Mitochondrien zerstörter Wirtszellen freigesetzt wird (Carp 1982). Darüber hinaus sind u.a. auch Rezeptoren für Komplementfaktoren (C3bi, C5a) vorhanden (Roitt et al. 1995). Für die Anheftung fremder Partikel stehen den neutrophilen Granulozyten neben den Komplementrezeptoren und Adhäsionsmolekülen auch die Rezeptoren für das konstante Fragment (Fc) des

(monomeren) Immunglobulins der G-Klasse (IgG; sog. "Fcγ-Rezeptoren") zur Verfügung. Durch die Beladung der Mikroorganismen mit Serumbestandteilen wie Komplementfaktoren und Immunglobulinen (man spricht von "opsoniert", d.h. schmackhaft gemacht) wird die Erkennung und Phagozytose in eine "Phagosom" genannte endosomale Vakuole erleichtert, die durch Einstülpung der Plasmamembran im Zuge des Phagozytoseprozesses entsteht. Bei all diesen Schritten spielen ständige Umstrukturierungsvorgänge am Zytoskelett eine bedeutende Rolle.

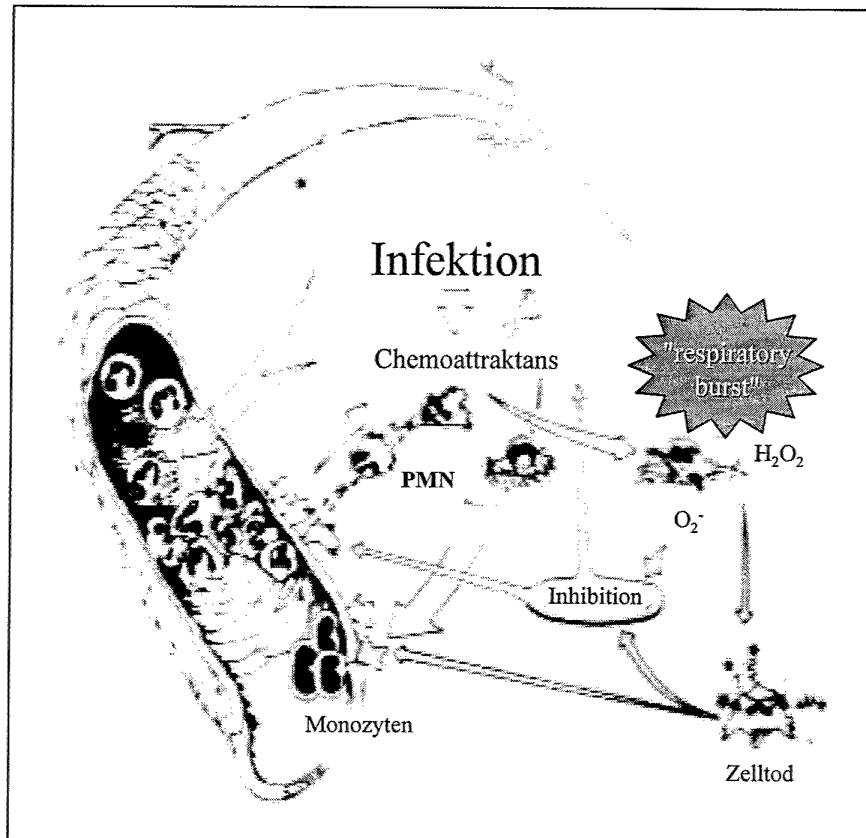


Abb. 1: Schema der unspezifischen Immunabwehr (modifiziert nach Gallin 1984).

1.1.3 Vorkommen und Biochemie der "respiratory burst"-Reaktion

Die biochemische Basis für die Bildung der Sauerstoffspezies ist die Aktivierung eines Enzyms, das als "respiratory burst-Oxidase" oder "NADPH-Oxidase" bezeichnet wird (Babior et al. 1976). Beide Begriffe werden nachfolgend nebeneinander benutzt. Das Vorkommen dieses Enzyms schien bis in jüngste Zeit auf Phagozyten beschränkt zu sein. Inzwischen konnten jedoch ähnliche Aktivitäten in Fibroblasten, T- und (Epstein-Barr-Virus-transformierten) B-Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen sowie weiteren Zelltypen

nachgewiesen werden (Meier et al. 1993; Cross & Jones 1991 sowie weitere dort aufgeführte Zitate). Gleichwohl sind die Quantitäten der im Zuge der "respiratory burst"-Reaktion von Neutrophilen gebildeten Sauerstoffmetabolite am größten. Deshalb ist dieses Modell auch das am besten charakterisierte, und die nachfolgenden Beschreibungen beschränken sich auf die Sauerstoffradikalbildung der neutrophilen Granulozyten.

Die "respiratory burst"-Oxidase ist eine NADPH:O₂-Oxidoreduktase, die im funktionsfähigen Zustand als Multipeptidketten-Komplex in der Plasma-/Phagosomenmembran vorliegt und dessen Zusammensetzung und funktionelle Regulation noch immer Gegenstand intensiver Forschung ist (Cross & Curnutte 1995; Johansson et al. 1995; Philips et al. 1995; für Reviews: vgl. Babior 1987; Morel et al. 1991; Cross & Jones 1991; Segal & Abo 1993; Chanock et al. 1994). Der Komplex beinhaltet eine Elektronentransportkette und besteht aus wenigstens 5 Polypeptidketten, die z.T. als konstitutiv membranständig angesehen oder im Zuge der Granulozytenaktivierung aus zytosolischer Lokalisation (spezifische Granula; Borregaard et al. 1983) an der Plasmamembran zusammengeführt werden (Abb. 2). Als (wenigstens teilweise) konstitutiv membranständig werden die beiden Untereinheiten (UE) des heterodimeren Cytochroms b₅₅₈ angesehen, die anhand ihrer Molekulargewichte als p22^{phox} (α-UE) und als gp91^{phox} (stark glykosylierte β-UE; Molekulargewicht: 76-92 kDa) bezeichnet werden (Segal & Abo 1993). Die Bezeichnung "phox" steht dabei für "Phagozyten-Oxidase-Faktor" (Nauseef et al. 1990). Dieses Hämprotein besitzt Bindungsstellen für FAD und NADPH und gilt als der eigentliche Elektronendonator auf Sauerstoff (Segal et al. 1992; Chanock et al. 1994; Bokoch 1995). Zwei weitere Oxidase-Komponenten, p47^{phox} und p67^{phox}, sind im Ruhezustand der Neutrophilen im Zytosol lokalisiert, werden nach Aktivierung der Zellen z.T. (p47^{phox}) phosphoryliert (Abb. 2; Chanock et al. 1994; El Benna et al. 1994) und translozieren unter Beteiligung des Zytoskelettes zur Plasmamembran (Bokoch 1995).

In jüngster Zeit finden zwei weitere Proteine (p40^{phox} und Rac2) als Bestandteile des Oxidase-Komplexes Akzeptanz (Knaus et al. 1991; Wientjes et al. 1993; Diekmann et al. 1994; Bokoch 1993 und 1995). P40^{phox} soll bevorzugt mit p67^{phox} assoziiert und bei CGD-Patienten, denen p67^{phox} fehlt, in reduzierter Menge vorhanden sein (Wientjes et al. 1993; Wientjes & Segal 1995). Rac2 gehört zur Familie der kleinen, Ras-verwandten GTP-bindenden Proteine (p21^{Rac2}) mit endogener GTPase-Aktivität (Bokoch 1995; Quinn 1995). Es liegt im Ruhezustand vermutlich an einen "Rho-Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitor" (RhoGDI) genannten Faktor komplexiert im Zytosol vor und wird nach Zellaktivierung durch den Austausch GDP → GTP aktiviert, was die Translokation von Rac2 an das bereits membranständige p67^{phox}-Molekül ermöglichen soll (Diekmann et al. 1994). Aus Untersuchungen an einem sog. "zellfreien System" [Zytoplastenpräparation, die mit definierten Zytosol- oder anderen Komponenten (freie Fettsäuren; anionische Detergenzien mit Mg²⁺ und GTP) inkubiert wird; Chanock et al. 1994] kann diese Translokation jedoch

weder als notwendig noch als ausreichend zur Aktivierung der NADPH-Oxidase angesehen werden (Philips et al. 1995).

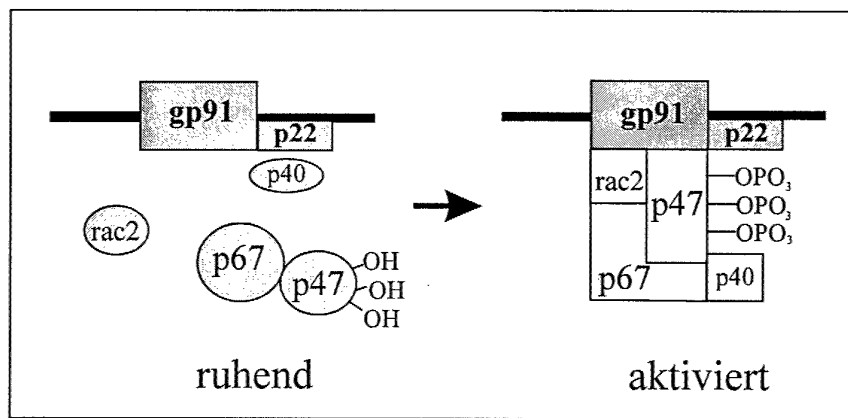


Abb. 2: Schema der NADPH-Oxidase-Komponenten und deren mögliche Form der Zusammenführung an der Plasmamembran (modifiziert nach Chanock et al. 1994).

Die Elektronen entstammen dem Pyridinnukleotid NADPH (vgl. Abb. 3; Babior 1987; Cross & Jones 1991), dessen oxidierte Form, NADP⁺, einen metabolischen Prozeß, den sog. Hexosemonophosphat-Shunt in Gang setzt (Fantone & Ward 1985; Rossi 1986; Morel et al. 1991). Dabei wird aus Glucose unter Beteiligung von Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH) NADPH regeneriert (Edwards 1994). Ähnlich der Situation bei CGD-Patienten sind G-6-PDH-Mangelpatienten durch häufig wiederkehrende bakterielle Infektionen gekennzeichnet (Yang & Hill 1991). Diese Beobachtung kann mit einer eingeschränkten "respiratory burst"-Aktivität der Phagozyten aufgrund der reduzierten Verfügbarkeit von NADPH als Kosubstrat der NADPH-Oxidase erklärt werden.

Die Übertragung eines Elektrons auf Sauerstoff durch den über Phagozytose oder durch lösliche Faktoren (freie Fettsäuren, Phorbolster; Chanock et al. 1994; Blobe et al. 1995; Khan et al. 1995) aktivierten NADPH-Oxidase-Komplex führt zur Bildung von dessen erster Reduktionsstufe, dem Superoxidanion O₂⁻ (Abb. 3; Babior et al. 1973). Dieses erste Sauerstoffradikal der "respiratory burst"-Reaktion wird physiologischerweise zunächst in die Umgebung der aktivierten Zelle abgegeben, bevor es nach vollendeter Phagozytose und komplettem Verschluß des Phagosoms in dieses Organell ausgeschüttet wird. Unter den sauren pH-Bedingungen des Phagosoms dismutiert das Radikal spontan oder durch Superoxiddismutase katalysiert zu Wasserstoffperoxid, H₂O₂ (Cohen 1994). Myeloperoxidase-Aktivität aus den azurophilen Granula der Granulozyten katalysiert die Reaktion von H₂O₂ mit Chloridionen unter Bildung der bakteriziden hypochlorigen Säure (Fantone & Ward 1985; Morel et al. 1991; Cohen 1994). Die weitere Reaktion unterhalogeniger Säuren mit Amingruppen-haltigen Verbindungen (Aminosäuren) zu Chloraminen kann ebenso als

Detoxifizierungsmechanismus gewertet werden wie der Abbau von H_2O_2 zu Wasser durch Katalase und/oder Glutathionperoxidase (Varani & Ward 1994). Weitere Reaktionsschritte können, durch Metallionen (Eisen- und/oder Kupferionen) katalysiert, die Bildung von Hydroxylradikalen, $\text{OH}^\bullet$ sowie u.U. auch von Singulett-Sauerstoff umfassen (Abb. 3; Fantone & Ward 1985; Morel et al. 1991; Wiles et al. 1995). Angesichts des Vorliegens von Metallen in Proteinkomplexen in der Zelle (z.B. an Ferritin oder Lactoferrin gebunden), wird den letztgenannten theoretischen Reaktionsmöglichkeiten jedoch nur in pathologischen Zuständen eine größere Bedeutung beigemessen (Rosen et al. 1995), wogegen die Reaktion von O_2^- mit hypochloriger Säure zum $\text{OH}^\bullet$ (Cohen 1994) eine größere Wahrscheinlichkeit besitzt, aber relativ langsam abläuft. Das Zusammenwirken der verschiedenen reaktiven Sauerstoffmetabolite mit nicht Sauerstoff-abhängigen Mechanismen [(proteolytische) Enzyme aus den drei verschiedenen Granula der Granulozyten ("Degranulation"); für Übersichten siehe dazu Cohen 1994; Selsted & Ouellette 1995] bewirkt die mikrobizide Potenz der "respiratory burst"-Reaktion.

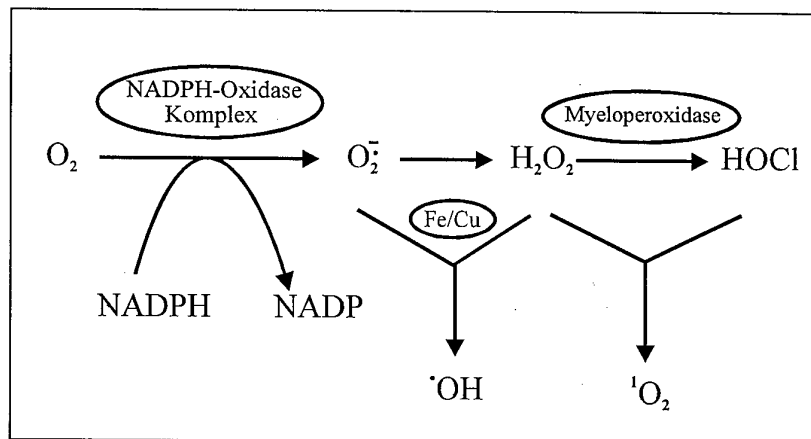


Abb. 3: Schema der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Aktivierung der NADPH-Oxidase (modifiziert nach Edwards 1994).

1.1.4 Die Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion (intrazelluläre Signalübertragung)

Unstimulierte, "ruhende" Neutrophile konsumieren relativ wenig Sauerstoff. Nach Kontakt mit spezifischen Stimuli wird jedoch innerhalb weniger Sekunden eine 50- bis 100-fache Zunahme des O_2 -Verbrauchs bestimmt (Morel et al. 1991). Der Sauerstoff wird praktisch vollständig in O_2^- -Radikale metabolisiert (Edwards 1994). Ligandenbindung an jeden der oben (Kap. 1.1.2) aufgeführten Rezeptoren führt zu einer (vermutlich lokalen) "Aktivierung" der Neutrophilen im Bereich der angesprochenen Rezeptoren. Die molekularen Mechanismen dieser Vorgänge sind jedoch nur in Ansätzen verstanden.

Die Aktivierung der Neutrophilen geschieht auf mehreren sog. "Signaltransduktionswegen", die vermutlich alle in den verschiedenen Phasen der Myelopoese zum reifen Granulozyten des peripheren Blutes realisiert sind und nachfolgend einleitend beschrieben werden sollen.

Die Aktivierung von Signaltransduktionswegen beginnt normalerweise mit der Bindung physiologischer Agonisten an ihre spezifischen Rezeptoren (vgl. Abb. 4). Da diese Agonisten im allgemeinen nicht die Barriere der Plasmamembran passieren können, besteht die Hauptaufgabe der Rezeptoren in der Weiterleitung des Signals ins Zellinnere. Dies erfolgt im wesentlichen durch drei unterschiedliche Mechanismen, die durch drei Rezeptortypen verwirklicht werden (Übersichten bei Frye 1992; Thelen et al. 1993; Heldin 1995).

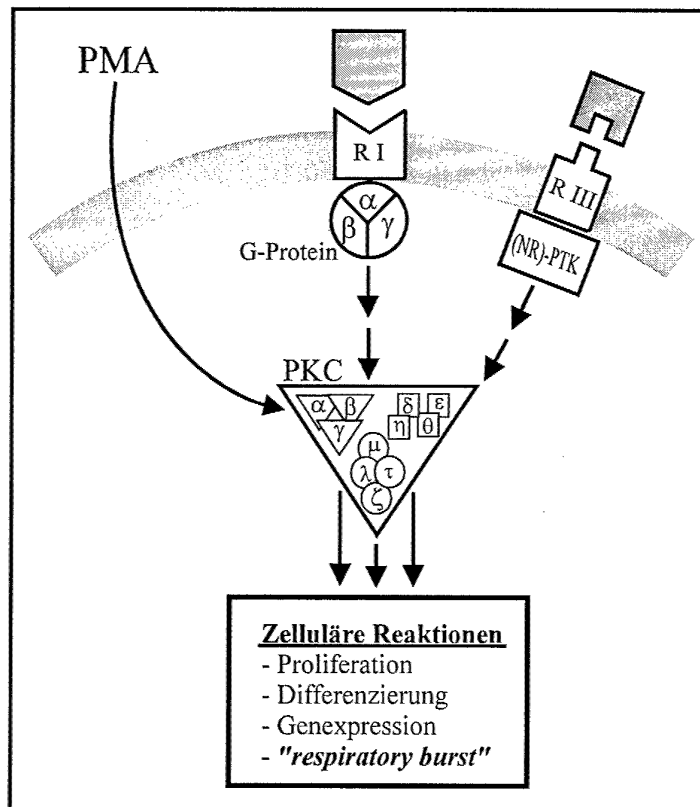


Abb. 4: Extrem vereinfachtes Schema der intrazellulären Signalübertragung durch Rezeptor (R I)-vermittelte Aktivierung von G-Proteinen oder Protein-tyrosinkinasen (PTK und R III) bzw. von PKC-Isoenzymen durch PMA.

1) Der Rezeptortypus I besitzt 7 transmembranöse Proteindomänen ["Heptahelix- oder 7-TMS- ("7 transmembrane-spanning domains")-Rezeptoren]. Er gehört damit zur Familie der Rhodopsin-Rezeptoren (Baggiolini & Dahinden 1994) und bedient sich zur Signalübertragung der Interaktion mit membranständigen heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen ("G-Proteine"; Abb. 4). Dazu zählen u.a. die Rezeptoren für Thrombin, IL-8,

Angiotensin, für das Komplementfragment C5a und den "platelet activating factor" PAF sowie der Rezeptor für das Chemotaxin f-MLP (Frye 1992; Thelen et al. 1993), der in dieser Studie besondere Bedeutung hat.

Das G-Protein-Trimer besteht aus einer katalytischen α -Untereinheit mit GTPase-Aktivität, an der GTP/GDP binden, und die sowohl mit den zugehörigen Rezeptoren einerseits als auch den nachfolgenden Effektorsystemen andererseits interagiert. Der $\beta\gamma$ -Komplex des G-Proteins verankert die α -UE in der Membran (Edwards 1994) und ist hinsichtlich seiner sonstigen Funktion in Neutrophilen nur sehr unzureichend charakterisiert (Thelen et al. 1993). Mehrere Isoformen der α -UE (α_i , α_s , α_q) und ihre Subspezies (z.B. α_{i-1} bis α_{i-3}) werden mit verschiedenen Effektorsystemen (Target-Enzymen) in Verbindung gebracht (Frye 1992).

In Neutrophilen wird als Effektorsystem durch die Isoform α_{i2} eine Phospholipase (PL) C (PLC β_2 ; Park et al. 1992) aktiviert, die spezifisch auf das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PtdInsP $_2$) als Substrat zurückgreift (Abb. 5). Die Hydrolyseprodukte von PLC β sind Inositol-1,4,5-Triphosphat (InsP $_3$) sowie Diacylglycerol (DAG); sie werden als "second messenger" bezeichnet. Während DAG in die Plasmamembran eingebunden bleibt (vgl. Abb. 6; Thelen et al. 1993; Edwards 1994), diffundiert InsP $_3$ ins Zytosol und erhöht durch Freisetzung von Ca $^{2+}$ -Ionen aus Speichern des endoplasmatischen Retikulums dessen intrazelluläre Konzentration (Berridge & Irvine 1989). Auch Ca $^{2+}$ -Ionen werden als "2nd messenger" gewertet.

Das Lipid DAG ist der physiologische Aktivator von Isoenzymen der Proteinkinase C-Klasse (PKC; Nishizuka 1988 und 1992). PKC-Aktivität phosphoryliert - im Gegensatz zu den unten aufgeführten Proteintyrosinkinasen - Proteine an den Aminosäuren Serin und Threonin. Diese Enzymaktivität ist als eine zentrale Schaltstelle für vielerlei zelluläre Regulationsvorgänge wie der Auslösung von Immunfunktionen sowie bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen anzusehen (vgl. Abb. 4). Es sind mindestens 12 Isoenzyme der PKC bekannt, die mit griechischen Buchstaben gekennzeichnet sind (Abb. 4). Sie werden in drei Gruppen eingeteilt, wobei für diese Arbeit in erster Linie die "klassische" Gruppe - PKC α , - β_I , - β_{II} und - γ - sowie PKC ζ aus der Gruppe der "atypischen" PKCs (Lord & Pongracz 1995) bedeutsam ist. Die klassischen PKC-Aktivitäten sind Ca $^{2+}$ -abhängig und durch DAG bzw. Analoga davon, z.B. Phorbol ester, stimulierbar (Nishizuka 1988 und 1992; Dekker & Parker 1994). Ligandenbindung an 7-TMS-Rezeptoren hat also DAG- und Ca $^{2+}$ -vermittelt bisher zur Aktivierung von PKC-Isoenzymen geführt.

2) Der Rezeptortyp II ist verkörpert durch Rezeptoren für sehr viele nicht-hämatopoetische Wachstumsfaktoren (epidermal growth factor, EGF; platelet-derived growth factor, PDGF; fibroblast growth factor, FGF, etc.; Frye 1992; Heldin 1995). Er ist charakterisiert durch eine zytoplasmatische Proteindomäne mit endogener Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität (Heldin 1995). Hier führt Ligandenbindung zur mehrfachen Autophosphorylierung dieser

Rezeptordomäne, welche die Voraussetzung bildet für das Andocken weiterer Proteine mit PTK- oder Phospholipase-Aktivität ($\text{PLC}\gamma_1$) oder für Proteine mit Adaptoreigenschaften (für neuere Reviews vgl. Khosravi-Far & Der 1994; Heldin 1995).

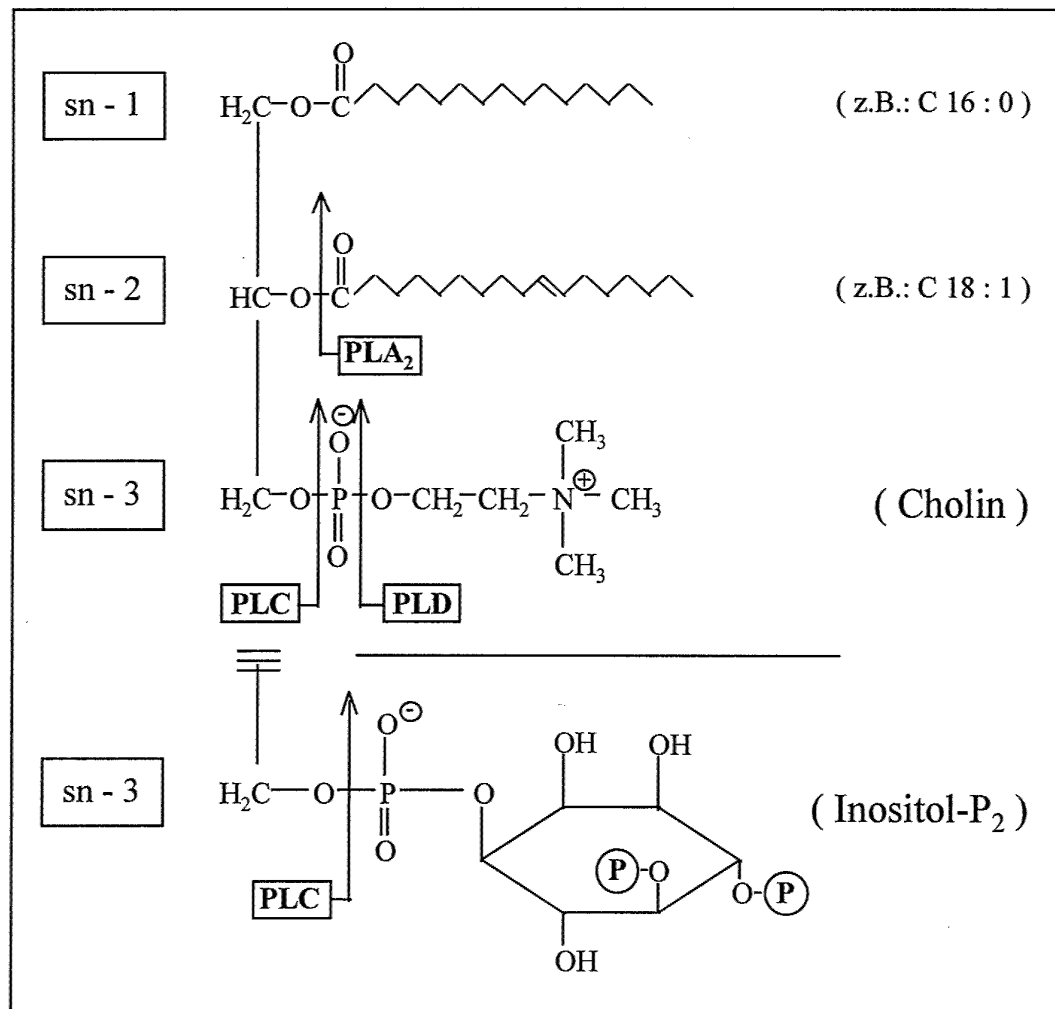


Abb. 5: Schematische Darstellung von Phosphatidylcholin (PtdCho) und Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PtdInsP₂) mit Schnitstellen der Phospholipasen (PL) C, D und A₂.

Auch $\text{PLC}\gamma_1$ metabolisiert PtdInsP₂ zu den o.g. Produkten, womit eine zweite Möglichkeit der DAG-Entstehung aufgezeigt ist. Da dieser Signaltransduktionsweg mit den daran beteiligten monomeren, sog. "kleinen" G-Proteinen aus der Ras-Superfamilie (Khosravi-Far & Der 1994) vermutlich bedeutsamer ist für die Zellbewegung und Granulafusion (Edwards 1994) sowie für mitogene Stimulation von Zellen, jedoch von untergeordneter Relevanz für die vorliegende Studie, wird er hier nicht näher ausgeführt.

3) Der Rezeptortyp III (Frye 1992) wird verkörpert durch Rezeptoren für viele Zytokine [Interleukine (IL-1 bis -7, -9, -10, -12), für Tumornekrosefaktoren (TNF), für Hormone

(Wachstumshormon, Prolaktin), für hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Erythropoetin sowie Granulozyten- und Granulozyten/Makrophagen-stimulierender Faktor, G- und GM-CSF; Taniguchi 1995)] und - für diese Arbeit von besonderer Bedeutung - für Fc γ -Rezeptoren. Dieser Typus besitzt nur z.T. eine zytoplasmatische Rezeptordomäne, die jedoch im Unterschied zum Typ II-Rezeptor keine eigene PTK-Aktivität aufweist. Hier erfordert die transmembranöse Signaltransduktion nach Ligandenbindung die Interaktion mit zytoplasmatischen PTKs, die selbst keine Rezeptorfunktion erfüllen (Frye 1992; Taniguchi 1995). Man hat Hinweise, daß die Aktivierung dieser Rezeptoren sich der Enzyme aus der "src"-Familie bedient, die sich von Protoonkogen-Produkten ableiten (Taniguchi 1995). Deren PTK-Aktivität - man spricht zur Unterscheidung von Rezeptortyp II von "Nicht-Rezeptor-Proteintyrosinkinasen" ("NR-PTK") - ist dann die Grundlage für die Signalweiterleitung in Form von PL-Aktivität (PLC γ_1) und/oder vermutlich über die relativ neu entdeckte Enzymfamilie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-K; Fry 1994; Kapeller & Cantley 1994). Die exakten molekularen Mechanismen dieser Art von Signaltransduktion sind bisher am wenigsten verstanden. Jedoch hätte auch hier eine mögliche Beteiligung von PLC γ_1 -Aktivität die Voraussetzung zur PKC-Stimulierung durch DAG-Produktion aus PtdInsP $_2$ als Substrat geschaffen.

Phosphatidylinositol-3 Kinasen sind in allerjüngster Zeit für die Strahlenbiologie besonders interessant geworden, da gezeigt werden konnte, daß ihre katalytische Untereinheit (p110) große Homologien sowohl zur DNA-aktivierten Proteinkinase, einem Reparatur-enzym für DNA-Doppelstrangbrüche, als auch zum Produkt des Ataxia teleangiectasia (AT)-Gens aufweist (Poltoratsky et al. 1995; Savitsky et al. 1995). AT ist bekanntermaßen (Hall 1994) eine Erkrankung, die mit einer extremen Erhöhung der zellulären Strahlenempfindlichkeit einhergeht.

Die bisher dargestellten Schritte der Aktivierung von Neutrophilen führten die beiden PtdIns-spezifischen Phospholipasen C β_2 und γ_1 als Produzenten für DAG auf. Als weitere Quelle für DAG in Neutrophilen ist eine PLD-Aktivität anzusehen, die auf den Hauptlipidbestandteil der Plasmamembran, Phosphatidylcholin (PtdCho; Abb. 5), als Substrat zurückgreift (Agwu et al. 1989; Billah et al. 1989; Cockcroft 1992; Exton 1994). Dieses Enzym ist jedoch im Gegensatz zu anderen Phospholipasen noch nicht kloniert und seine Regulation ist noch weniger klar als die der anderen PL (Exton 1994; Powis et al. 1995). Es ist eine Ca $^{2+}$ -Abhängigkeit der Aktivierung beschrieben worden (Kessels et al. 1991) und Regulationsmöglichkeiten durch G-Proteine, PKC- sowie PTK-Aktivitäten werden diskutiert (Cockcroft 1992; Exton 1994). Die genauen Mechanismen der Aktivierung sind jedoch weitgehend unbekannt. PLD-Aktivität erfordert zur DAG-Bereitstellung ein weiteres Enzym, Phosphatidylphosphohydrolase (PPH), da das Primärprodukt von PLD, Phosphatitsäure (PA), durch PPH-Aktivität zu DAG dephosphoryliert werden muß (Billah

et al. 1989a; Gay & Murray 1991). PA selbst wird von manchen Autoren (Rossi et al. 1990; Agwu et al. 1991; Exton 1994) als der eigentliche "second messenger" zur Aktivierung der NADPH-Oxidase postuliert, was die Komplexität der Zusammenhänge noch verstärkt.

Damit sind bisher drei Wege zur DAG-Bereitstellung durch verschiedene Enzymaktivitäten ($\text{PLC}\beta_2$ und γ_1 sowie PLD mit PPH) aus zwei Substratquellen (PtdInsP_2 und PtdCho) zum Zwecke der PKC-Aktivierung in Neutrophilen aufgezeigt worden. Eine weitere potentielle Quelle besteht in der Nutzung des PtdCho -Pools durch eine PtdCho -spezifische PLC (PtdCho-PLC ; Billah and Anthes 1990). Ihre Rolle bei der Neutrophilenaktivierung ist bisher noch völlig unklar (Cockcroft 1992; Thelen et al. 1993; Exton 1994), ebenso wie die Signaltransduktionswege zu ihrer Aktivierung, und wird daher auch Gegenstand der vorliegenden Studie sein.

Die weiteren Schritte zur Aktivierung der NADPH-Oxidase gehen davon aus, daß nach DAG-(PA?)-Bildung PKC-Isoenzyme aus dem Zytosol zur Plasmamembran translozieren (Abb. 6) und dort in einem Zusammenspiel von Lipid(en) und Ca^{2+} aktiviert werden. Dies erfolgt unter entscheidender Beteiligung des Zytoskelettes (Nauseef et al. 1991), wobei die exakten Mechanismen jedoch noch immer nicht bekannt sind (Lord & Pongracz 1995). PK(C)-Aktivität phosphoryliert beide Cytochrom b-UE des Oxidase-Komplexes sowie den Oxidase-Faktor p47^{phox} an 7-9 Serinresten (s. Abb. 2; El Benna et al. 1994) und erleichtert möglicherweise damit dessen Translokation und Einbindung in den Komplex, als Voraussetzung für dessen volle Funktionsfähigkeit zur Produktion von Superoxidanionen.

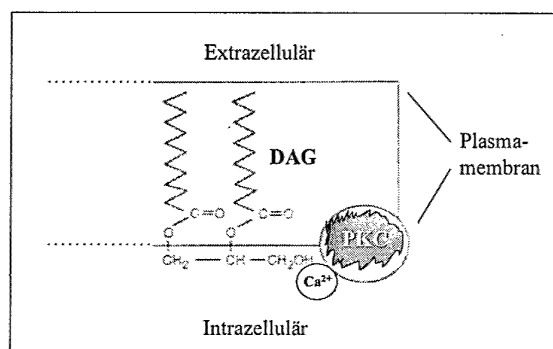


Abb. 6: Schema der Aktivierung von PKC durch "Translokation" an die Plasmamembran (modifiziert nach Edwards 1994).

Für eine essentielle Einbindung von PKC-Aktivität in den o.g. Aktivierungsmechanismus der NADPH-Oxidase spricht deren direkte Stimulierbarkeit mit Agonisten, welche die Signalübertragungskaskade über Rezeptoren und PL-Aktivität/"2nd messenger"-Produktion umgehen, und durch Bindung an PKC alleine eine "respiratory burst"-Reaktion auslösen

können. Der dafür klassische Stimulus ist der Phorbolester Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), der als stereochemisches Analogon von DAG an das regulatorische Zentrum der konventionellen PKC-Isoenzyme bindet (Hecker 1978). Darüber hinaus können Inhibitoren von PKC-Aktivität derartige Stimuli sehr gut antagonisieren (Dewald et al. 1989). Die relativ langsame Kinetik der PMA-stimulierten Reaktion im Vergleich zur Rezeptor-vermittelten Antwort deutet jedoch bereits darauf hin, daß PKC-Aktivität nur einen Teil des Signaltransduktionsprozesses ausmachen kann (Wymann et al. 1987). Eine grob schematische Darstellung der drei im Rahmen dieser Studie näher untersuchten Signaltransduktionskaskaden zeigt Abb. 4 (s.o.).

1.1.5 Pathophysiologie der "respiratory burst"-Reaktion

Die reaktiven Sauerstoffspezies der "respiratory burst"-Reaktion werden für eine ganze Reihe pathologischer Zustände (mit)verantwortlich gemacht (Weiss 1989). Das am besten untersuchte Modell sind hierbei oxidative Schäden am Endothel der Blutgefäße als primäres Target einer akut-entzündlichen Reaktion (Varani & Ward 1994), das nachfolgend beispielhaft skizziert werden soll. Hier wird die Deposition von Immunkomplexen (IKs; aus Antigen und Antikörper) in der Folge einer inflammatorischen Reaktion als Auslöser für die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen und deren Sezernierung von Zytokinen (TNF- α und IL-1 β) angesehen (Ward & Mulligan 1992). Diese Zytokine induzieren die gleichzeitige Hochregulation der jeweiligen Adhäsionsmoleküle (CD11b/- und CD11c/CD18 bzw. CD54/ICAM-1 und CD62/E-Selectin) auf den beiden beteiligten Zelltypen, den angelockten Granulozyten und den Endothelzellen, was einen besonders engen Zell-Zell-Kontakt ermöglicht. In einem "frustrierte Phagozytose" (Henson 1971) genannten Vorgang sollen die Granulozyten dabei große Mengen an Sauerstoffradikalen abgeben. Durch einen komplexen Prozeß unter Beteiligung von Xanthin-Oxidase, O₂⁻ und Eisenionen aus den Endothelzellen kommt es zur Bildung des OH[•]-Radikals als dem vermutlich Endothel-schädigenden Agens, so daß die Endothelzelle selbst - nach Initiation durch Granulozyten - an ihrer Zerstörung mitwirkt. Das eigentlich kritische zelluläre Target ist allerdings nicht bekannt (Ward & Mulligan 1992; Varani & Ward 1994). Neben den oben erwähnten Zytokineffekten auf Adhäsionsmoleküle, werden auch direkte zytotoxische Effekte der beiden Zytokine auf Endothelzellen diskutiert (Varani & Ward 1994).

Grundsätzlich kann jedes Organ nach Entzündung, Trauma und Ischämie/Reperfusion von oxidativen Schäden betroffen sein (Jackson & Cochrane 1988; Farber et al. 1990; Styrt 1990; Yang & Hill 1991) und eine entsprechende Aufstellung (McCord 1992) führt praktisch alle Organe mit jeweils einer Reihe von pathologischen Zuständen auf, zu denen Sauerstoffradikale als (mit)verursachend diskutiert werden.

1.2. Das HL-60 Modell

Die HL-60 Zelllinie entstammt einer humanen Promyelozytenleukämie (siehe dazu auch Kap. 4.1) und wurde vor mehr als 20 Jahren im Laboratorium von Professor R. Gallo, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA etabliert (Collins et al. 1977). Die Zelllinie ist charakterisiert durch ihre Kultivierbarkeit in Suspension und insbesondere durch die Induzierbarkeit ihrer terminalen Differenzierung durch verschiedene Faktoren. Es sind Differenzierungen sowohl entlang der granulozytären (neutro-, baso- und eosinophile) als auch der monozytären Entwicklungsreihen beschrieben (Abb. 7; Collins et al. 1978 und 1980; Fischkoff et al. 1984; Hutt-Taylor et al. 1988, Leglise et al. 1988; Howe et al. 1990; Nauseef et al. 1990; Sandler et al. 1993; Review: Collins 1987). Zu den Induktoren der Differenzierung in granulozytäre Reihen gehören polar-planare Verbindungen wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (Collins 1987), Pyrimidinanalogue wie 3-Deazo-Uridin (Koeffler 1983) und Chemotherapeutika wie Actinomycin D (Lotem & Sachs 1980) sowie Dibutyryl-cAMP (dbcAMP; Perez et al. 1992) und Retinsäure (Matzner et al. 1987). Die monozytäre/Makrophagen-ähnliche Differenzierung wird durch Tumorpromotoren wie den Phorbol ester PMA (Rovera et al. 1979) sowie durch Vitamin D-Analogue (Rossi et al. 1987; Wang et al. 1991) ausgelöst.

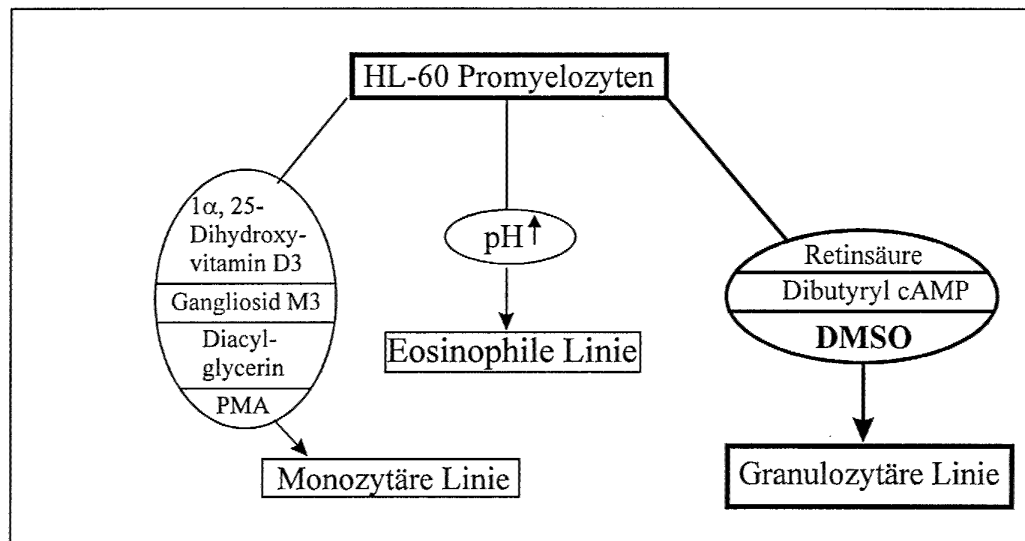


Abb. 7: Induzierbarkeit von HL-60 Zellen zur terminalen Differenzierung in Granulozyten (neutro-, eosino- und basophile) sowie Monozyten/Makrophagen (modifiziert nach Nauseef 1990).

Die Eigenschaft der induzierbaren Differenzierbarkeit hat die HL-60 Zelllinie zu einem beliebten Modell für Untersuchungen der späten Myelopoese werden lassen, die gekennzeichnet ist durch abnehmende Proliferationskapazität bei zunehmender funktioneller Reife (Collins 1987; Nuzhat et al. 1991; Sandler et al. 1993). Zur Differenzierung in die

granulozytäre Reihe induzierte HL-60 Zellen stellen im Laufe einer Woche nach Inkubation mit DMSO ihre Proliferationsaktivität ein und verlieren ihre für proliferierende Zellen charakteristischen nukleären Antigene ["proliferating cell nuclear antigen", PCNA (Celis et al. 1987; Hall et al. 1990; Sandler et al. 1993) und das "Ki-67"-Antigen (Landberg & Roos 1991)]. Sie erwerben dabei phänotypische und funktionelle Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Chemotaxis, zur Phagozytose und zur Auslösung des "respiratory burst", die typisch für reife neutrophile Granulozyten sind (Collins 1987; Matzner et al. 1987; Sandler et al. 1993; Kaffenberger & van Beuningen 1994). Die dabei auftretenden phänotypischen Veränderungen beinhalten die beginnende Expression von Adhäsionsmolekülen aus der β_2 -Unterfamilie der Integrine (Aihara et al. 1991) und von Rezeptoren für chemotaktische Peptide wie f-MLP (Fontana et al. 1980; Matzner et al. 1987; Perez et al. 1992).

Auch als Modell in der strahlenbiologischen Forschung hat die HL-60 Zelllinie Anerkennung gefunden. Dabei wurden in der Vergangenheit jedoch meistens uninduzierte, d.h. als Promyelozyten wachsende HL-60 Zellen verwendet. Collins et al. (1980) und Weichselbaum et al. (1981) berichteten über die Strahlenempfindlichkeit der HL-60 Zellen. Da zahlreiche Subklone der ursprünglichen Zelllinie existieren (Toksoz et al. 1982) schwanken auch die Angaben für D_0 -Werte zwischen 0,83 und 1,7 Gy und für D_q -Werte zwischen 0,13 und 0,8 Gy (Weichselbaum et al. 1981, Rhee et al. 1985, Laver et al. 1986). Sie bewegen sich aber durchaus im Dosisbereich, der für hämatopoetische Progenitorzellen in vitro berichtet wird (D_0 : 0,9 bis 1,3 Gy; D_q : 0 bis 0,6 Gy; Laver et al. 1987; FitzGerald et al. 1986; Lehnert et al. 1986; Nothdurft 1991). Die Werte D_0 und D_q sind strahlenbiologische Kenngrößen, die Maßzahlen für die intrinsische Strahlenempfindlichkeit bzw. für die Fähigkeit der Zellen den subletalen Strahlenschaden zu reparieren, darstellen (Hall 1994).

Über die molekularen Mechanismen der Induktoren der Differenzierung der HL-60 Zellen gibt es relativ wenig gesichertes Wissen (Leglise et al. 1988). Die DMSO-Wirkung wird nur über permanente Inkubation der Zellen mit dem Induktor erzielt (Sandler et al. 1993). Frühere Untersuchungen (Farzaneh et al. 1987 und 1987a; Bhatia et al. 1990) berichten über DMSO-induzierte DNA-Strangbrüche und deren Reparatur während der Differenzierung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen. Ähnlich dem DMSO-Effekt zur Neutrophilendifferenzierung, haben Aihara et al. (1991) die Notwendigkeit einer kontinuierlichen PKC-Aktivierung durch PMA zur Differenzierung von HL-60 Zellen zu Makrophagen aufgezeigt. Nach DMSO-Induktion wurden auch Veränderungen im PKC-Muster gefunden (Tanaka et al. 1992).

Das HL-60 Modell war in der Vergangenheit auch wertvoll für das Studium der molekularen Regulation der Granulozytenreifung, wofür nachfolgend einige Beispiele

aufgeführt werden. Aus HL-60 Zellen gelang die Klonierung der cDNA des Myeloperoxidase-Gens (Morishita et al. 1987; Weil et al. 1987) sowie der Rezeptoren für das Formylpeptid (Boulay et al. 1990) und für das Anaphylatoxin C5a (Boulay et al. 1991). Die Klonierung der Faktoren *Rac1* und *Rac2*, denen eine Bedeutung bei der Neutrophilenaktivierung beigemessen wird (für *Rac2* beim Menschen, siehe Kap. 1.1.3), erfolgte ebenso aus HL-60 Zellen (Didsbury et al. 1989) wie - mehr die Signaltransduktion und die eigene Arbeit betreffend - die Darstellung von PLD-Aktivität und Untersuchungen zu deren Regulation (Brown et al. 1993).

Das HL-60 Modell kann deshalb zusammenfassend hinsichtlich seiner hämatologisch-entwicklungsbiologischen wie hinsichtlich seiner klassisch-strahlenbiologischen Charakterisierung als etabliert angesehen werden. Untersuchungen an diesem Modell zu moderneren strahlenbiologischen Fragestellungen wie der Strahlenwirkung auf zytoplasmatische und Membran-Targets fehlen allerdings bisher weitgehend.

Die HL-60 Zelllinie wurde in dieser Studie ausgewählt, um an ihr - in Ergänzung zu den Versuchen an Neutrophilen - die Verwendbarkeit einer myeloischen Zelllinie für Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf Elemente der intrazellulären Signaltransduktion zu überprüfen. Es bestand die Erwartung, daß bei einer etablierten permanenten Zelllinie weniger ausgeprägte individuelle Variabilität hinsichtlich der Untersuchungsparameter besteht, wie sie selbst bei wiederholten Blutentnahmen beim gleichen Spender beobachtet wird.

1.3 Strahlenwirkung auf Elemente der intrazellulären Signaltransduktion

Untersuchungen zur Strahlenwirkung auf intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse erfolgten bisher in erster Linie vor dem Hintergrund einer möglichen radiogenen Modulation der Genexpression (für Reviews vgl.: Weichselbaum et al. 1991; Coleman et al. 1993). Dabei standen die Fragen der Induktion von Zytokinen wie dem Tumornekrosefaktor- α (Hallahan et al. 1989) und Interferon (IFN; Woloschak & Chang-Liu 1990) sowie der Veränderungen der Proliferation bestrahlter Zellen deutlich im Vordergrund (für Reviews vgl.: Keyse 1993; Weichselbaum et al. 1993). Die Arbeitsgruppe um Weichselbaum (Sherman et al. 1990; Hallahan et al. 1991a) konnte durch Bestrahlung von HL-60 und anderen humanen Zellen mit 3 bis 50 Gy auf mRNA-Niveau die Induktion der Transkription von Genen (*c-jun*, *egr-1*) zeigen, die wiederum für Transkriptionsfaktoren kodieren, während in mit 0,5 bis 2 Gy bestrahlter Haut vom Schwein die Expression des *c-fos* Protoonkogens überwog (Martin et al. 1993). Der strahleninduzierten Erhöhung von PKC-Aktivität (Woloschak et al. 1990) kommt bei den Induktionen der Genexpression

offensichtlich eine bedeutende Rolle zu (Hallahan et al. 1991a und b). Dies gilt auch für die Induktion von TNF- α . Die Inhibition (z.B. durch H-7) oder Depletion von PKC-Aktivität mittels chronischer PMA-Behandlung der HL-60 Zellen reduziert die TNF-Induktion (Hallahan et al. 1991).

Die Erhöhung von PKC-Aktivität könnte aber auch nur ein indirekter Strahleneffekt sein, dem eine Oxidation von Phospholipiden der Membran vorausgehen könnte (Abb. 8). Sowohl die Inhibition von Phospholipase A₂-Aktivität, die für die Entfernung oxidierter Membranlipide verantwortlich ist (van Kuijk et al. 1987), als auch die Inhibition der Bildung bzw. der Metabolisierung des PLA₂-Produktes Arachidonsäure (AA) durch Pentoxifyllin bzw. Ketoconazol (Inhibitor von Lipoxygenase-Aktivität) führten zu reduzierter TNF-Expression auf mRNA-Niveau (Hallahan et al. 1994 und 1994a). Im Falle der PLA₂-Inhibition mit gleichzeitiger Abnahme des AA-Gehaltes der Zellen war dieser von einer Reduktion von PKC-Aktivität begleitet (Hallahan et al. 1994), woraus eine AA-vermittelte Stimulation von PKC-Aktivität ebenso abgeleitet werden kann wie aus den Ketoconazol-Ergebnissen ein (unbekannter) Pathway mit Lipoxygenase-Beteiligung, der ebenfalls zu TNF-Induktion führt (Hallahan et al. 1994a).

Darüber hinaus konnte in einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie die Induktion einer PLD-Aktivität durch eine Bestrahlung mit γ -Strahlen mit einer Dosis von 2 Gy demonstriert werden (Avila et al. 1993).

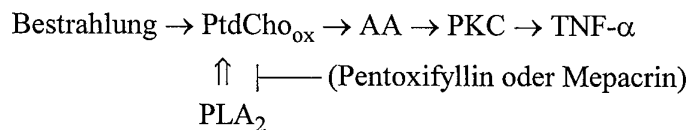


Abb. 8: Schema einer möglichen Signaltransduktionskaskade zur Induktion von TNF- α durch ionisierende Strahlung (modifiziert nach Hallahan et al. 1994a).

Parallel zu den o.g. Untersuchungen konnten Uckun und Mitarbeiter bei bestrahlten B-Lymphozyten-Vorläuferzellen zeigen, daß auch (bisher nicht eindeutig identifizierte) PTK durch ionisierende Strahlung stimuliert werden können (Uckun et al. 1992), und daß diese PTK-Aktivität in einer Signaltransduktionskaskade proximal von einer Aktivierung von PKC angeordnet sein muß (Uckun et al. 1993). Die Hemmbarkeit der PKC-Aktivierung bei gleichzeitiger Reduktion des PtdIns-Metabolismus (InsP₃-Freisetzung) durch Inhibitoren von PTK-Aktivität (Genistein und Herbimycin A) deutet hier auf eine strahlen-induzierte PLC- γ -Aktivität hin (Weichselbaum et al. 1994), deren Produkte PKC aktivieren können (vgl. Kap. 1.1.4).

Darüber hinaus konnte für die zelluläre Antwort auf UV(C)-Bestrahlung in einem Zellkern-freien System inzwischen gezeigt werden, daß die dabei beobachtete Aktivierung des

zytosolischen Transkriptionsfaktors, Nuklearfaktor (NF)- κ B, ohne ein vom Kern ausgehendes Signal erfolgen kann (Devary et al. 1993).

Zum Mechanismus der Strahlenwirkung hatten Arbeiten aus der Kufe-Gruppe (Datta et al. 1992) zuvor bereits belegen können, daß durch ionisierende Strahlung induzierte reaktive Sauerstoffspezies auf Elemente von Signaltransduktionskaskaden Einfluß ausüben, da diese durch Moleküle mit Radikalfänger-Eigenschaften wie N-Acetylcystein reduziert werden können. Damit zeigt sich ein generellerer Regulationsmechanismus derartiger Prozesse über Veränderungen im Redoxpotential der Zellen, und reaktiven Sauerstoffspezies kommt eine wachsende Bedeutung als "messenger"-Molekülen zu (Khan & Wilson 1995). Gemäß dieser Modellvorstellung sollten auch andere oxidative Einflüsse, z.B. H_2O_2 -Applikation, auf Signaltransduktionsvorgänge Einfluß ausüben können. Entsprechende Experimente belegen die Stimulation von "Mitogen-aktivierter Protein-Kinase"- (MAPK)-Aktivität (Stevenson et al. 1994), die PLA_2 -vermittelte Induktion der Transkription des *c-jun*-Genes (Rao et al. 1993) sowie die Aktivierung von NF- κ B (Schreck et al. 1991).

Zusammenfassend ist somit eine Regulation strahleninduzierter Genexpression durch extranukleäre Signaltransduktionsvorgänge, die z.B. an der oxidierten Plasmamembran ihren Ausgang nehmen können und die vermutlich zu "Pathways", die durch DNA-Schäden initiiert werden, parallel verlaufen (Coleman 1993; Weichselbaum et al. 1994), aufgezeigt worden. Weitergehende Untersuchungen zu zellulären Reaktionen auf Bestrahlung, die nicht zwangsläufig mit veränderter Genexpression einhergehen, stehen allerdings noch aus.

1.4 Fragestellung

Die "respiratory burst"-Reaktion der Phagozyten ist ein essentielles Element der unspezifischen Immunantwort am Ende einer Reaktionskette nach einem infektiösen und/oder inflammatorischen Stimulus. Sie beinhaltet die "Aktivierung" des multifaktoriellen Enzymkomplexes der NADPH-Oxidase auf Wegen, deren genaue(r) Verlauf (Verläufe) noch größtenteils im Dunkeln liegen. Die Aktivität dieses Enzyms führt in mehreren Reaktionsschritten zu einer Vielzahl von reaktiven Sauerstoffverbindungen, welche es dem Phagozyten ermöglichen, auf phagozytierte Mikroorganismen mikrobizid zu wirken. Gleichzeitig birgt die unkontrollierte Herstellung und Abgabe der Sauerstoffspezies durch "hyperaktive" Zellen oder versagende Schutzmechanismen die Gefahr der oxidativen Schädigung gesunden Gewebes. Die zelluläre Antwort der Phagozyten auf einen physiologischen Stimulus muß deshalb einer fein abgestimmten Regulation unterliegen, um einerseits der mikrobiziden Aufgabe gerecht werden zu können und um andererseits ihre

gesunde Umgebung möglichst wenig zu schädigen. Fehlsteuerungen dieser Regulation könnten somit die pathophysiologischen Grundlagen bilden sowohl für die Entwicklung schwerwiegender und lebensbedrohlicher Infektionen - wie im Falle der CGD-Patienten - als auch für inflammatorische Schäden (Reperfusionsschäden, ARDS-Syndrom, etc.), die von Oxidanzien ausgehen.

Wie ionisierende Strahlung auf diese Regulationsvorgänge der Aktivierung der NADPH-Oxidase wirkt, ist bisher nicht untersucht und wurde zum Inhalt dieser Studie gewählt. Ein Aspekt, der das Interesse für diese Untersuchungen insbesondere weckte, war die Beobachtung, daß in Strahlenopfern des Reaktorunfalls in Chernobyl von 1986 noch mehr als fünf Jahre nach der Exposition eine Fehlregulation des "respiratory burst" mit z.T. extrem erhöhten Zellantworten auf die Stimulation *in vitro* beobachtet werden konnte (Kaffenberger et al. 1996). Das besondere Interesse, die Einwirkung ionisierender Strahlung auf die Signalübertragungskaskaden, die beim "respiratory burst" eine Rolle spielen, zu untersuchen, ergibt sich dadurch, daß dieselben Spezies an reaktiven Sauerstoffradikalen sowohl durch ionisierende Strahlung einerseits als auch durch den zellulären metabolischen Prozeß des "respiratory burst" andererseits gebildet werden. Nach akzidenteller Strahlenexposition könnten die Sauerstoffradikale durch eine strahleninduzierte Fehlregulation der Signaltransduktion zur Auslösung des "respiratory burst" einen Beitrag zur Pathogenese der akuten Strahlenkrankheit leisten, während sie unter den Bedingungen der therapeutischen Strahlenanwendung für unerwünschte Effekte der Therapie an gesunden Geweben verantwortlich sein könnten.

Untersuchungen an immunologischen Zellen (B-Lymphozyten-Vorläufer-Zellen und Promyelozyten) haben bereits die grundsätzliche Beeinflußbarkeit von zytoplasmatischen und Membran-Elementen mit Funktionen in der intrazellulären Signaltransduktion durch - z.T. sehr hohe Dosen - ionisierender Strahlung aufgezeigt. Offensichtlich besitzt die Zelle "Sensoren", die ihr die stattgefundene Bestrahlung - vermutlich in Form der Sauerstoffradikale - mitteilen, worauf Veränderungen in der (den) Signaltransduktionskaskade(n) zu entsprechenden Zellantworten führen.

Ziel dieser Arbeit war das Studium des Einflusses ionisierender Strahlung auf die Mechanismen der Signaltransduktion zur Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion in neutrophilen Granulozyten und in zu Neutrophilen differenzierenden HL-60 Promyelozyten. Die Untersuchungen am "respiratory burst" der Neutrophilen/HL-60 Zellen haben modellhaften Charakter. Sie sollen auch mögliche Strahleneffekte auf andere biologische Endpunkte, z.B. Zellaktivierungsprozesse durch Zytokine oder die Induktion bzw. Inhibition von Apoptose, reflektieren. Es besteht die Erwartung, daß vom Verständnis dieser molekularen Vorgänge und deren Beeinflußbarkeit neue therapeutische Konzepte und Strategien

ausgehen werden, die sowohl dem akut strahlenkranken Patienten als auch dem Tumorpatienten unter einer Radiotherapie Hilfe bringen werden.

Im einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1) Auf welchen Kaskaden der intrazellulären Signalübertragung erfolgt die Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase in neutrophilen Granulozyten?

Eine der angewandten experimentellen Taktiken war, hypothetisch bestimmte Stoffwechselvorgänge bei der Signaltransduktion zu fordern, diese dann pharmakologisch zu blocken, um die Hypothese zu bestätigen oder zu verwerfen.

Die Beantwortung der o.g. Frage bildete die wissenschaftliche Basis für die Bearbeitung der folgenden Frage:

2) Gibt es innerhalb dieser Kaskaden bisher unbekannte, strahlenbiologisch-relevante Targets, die sich zur besseren Definition von Krankheiten auf molekularer Ebene eignen, um damit neue Ansätze für eine verbesserte Therapie zu gewinnen?

Angeichts der Probleme mit der inter- und intraindividuellen Variabilität bei Untersuchungen an menschlichem Untersuchungsmaterial, sollte darüber hinaus die folgende Frage beantwortet werden:

3) Eignet sich für Untersuchungen der Signaltransduktion, die zu Auslösung einer Immunfunktion führt, auch die HL-60 Zelllinie nach deren Induktion zur (granulozytären) Differenzierung?

Die positive Beantwortung dieser Frage würde dazu beitragen dieses HL-60 System als biologisch-relevantes Modell zu etablieren und die differenzierten HL-60 Zellen mit reifen Neutrophilen vergleichbar machen. An beiden Zelltypen können akute Strahleneffekte, z.B. auf die intrazelluläre Signaltransduktion, studiert werden. Darüber hinaus können an zur Differenzierung induzierten HL-60 Zellen - jedoch nicht an Neutrophilen - Strahleneffekte erforscht werden, die evtl. mit Veränderungen am genetischen Material und/oder dessen Nutzung (z.B. durch veränderte Genexpression) einhergehen. Denn HL-60 Zellen können als hämatopoetische Progenitorzellen angesehen werden, die nach Induktion der Differenzierung in beliebigen diskreten Reifestadien bestrahlt werden können. Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen können in diesen reifenden Zellen die Strahlenwirkungen auf vielerlei biologische Endpunkte im Zeitraum bis mehrere Tage nach Induktion/Bestrahlung untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellen für Reagenzien

Fa. Aldrich, Steinheim: Diphenylenjodonium-Jodid

Fa. Amersham Buchler, Braunschweig: ECL-Reagenz; "Megaprime™ DNA Labelling System"; Molekulargewichtsmarker für Protein-Elektrophorese ("Rainbow™"); Protein-kinase C Enzymkit

Fa. Becton Dickinson, Heidelberg: monoklonale Maus- α human Antikörper (als FITC- oder PE-Konjugate) gegen CD-Antigene (CD3, CD4, CD8, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD25; CD45, IgG_{1/2a}-Isotyp-Kontrollen); "FACSFlow™"- und "Simultest™ IMK plus Lysing"-Lösungen

Fa. Biomol, Hamburg: DEDA; H-7; Herbimycin A; LY294002; monoklonaler Maus- α human Antikörper gegen Phosphatidylinositol 3-Kinase (Klon CA-3); Okadaic acid; Wortmannin

Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim: nicht-essentielle Aminosäuren; fötales Kälberserum; L- α -Lysophosphatidylcholin; Leupeptin; "Complete™ Proteasen-Inhibitor-Cocktail"; "QuickSpin™"-Säulen; RPMI 1640-Kulturmedium; Sephadex G50-fine; Staurosporin; Trypsin-Inhibitor

Fa. Calbiochem, Bad Soden: R59 022; U73122; U73343

Fa. Du Pont de Nemours, Bad Homburg: α -P-32-dCTP

Fa. Fluka, Neu-Ulm: Benzoesäureanhydrid, Formamid; N,N'-Methylenbisacrylamid

Fa. ICN, Meckenheim: γ -P-32-ATP; Guanidinthiocyanat; Lymphozytenseparations-Medium

Fa. Life Technologies (Gibco BRL), Eggenstein: PMSF

Fa. Medac, Hamburg: monoklonale Maus- α human Antikörper (als PE-Konjugate) gegen CD32- und CD64-Antigene, IgG₁-Isotyp-Kontrollen

Fa. Merck, Darmstadt: Acetonitril; Acrylamid; Ammoniak; Benzol; Bromphenolblau; Chloroform; 4-(Dimethylamino)-Pyridin; Dimethylformamid; Formaldehyd; Glycin; Hexan; HEPES; Magermilchpulver; Methanol; SDS; Wasserstoffperoxid; alle nicht extra aufgeführten Puffersubstanzen sowie Vor- und Trennsäulen der HPLC-Analytik

Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA: Dihydrorhodamin 123; Hexapeptid- (formyl-Norleucin-Leucin-Phenylalanin-Norleucin-Tyrosin-Lysin)-FITC-Konjugat; N-[7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolyl (NBD)]-Phalloidin (NBD-Phalloidin)

Fa. Pharmacia, Freiburg: Protein A-Sepharose; Sephadex G-50

Fa. Santa Cruz, Heidelberg: mono- und polyklonale Primärantikörper (Maus/Kaninchen) gegen humane PKC α (Klon C-20), β_I (C-16), β_{II} (C-18), γ (C-19), ζ (N-20), PLC β_1 (G-12), γ_1 (1249), γ_2 (C-19), PLA $_2$ (N-216), *Src* p60 (N-16), *Raf-1* (C-12); *Fgr* (N-47); Peroxidase-Konjugate sekundärer Antikörper (Ziege) gegen Kaninchen- oder Maus-IgG

Fa. Serva, Heidelberg: Ammoniumpersulfat; bovines Serumalbumin (Fraktion V); Cytochalasin B; Dimethylsulfoxid; Ethidiumbromid; Glycerin; Na-Lauroylsarcosyl; Nitroblau-Tetrazolium-Salz; N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin; Tween 20

Fa. Sigma, Deisenhofen: Agarose Low EEO; Antikörper: polyklonaler Ziege- α human IgG [F(ab') $_2$ -Fragment]; monoklonaler Maus- α Phosphotyrosin-FITC (Klon PT-66); IgG $_1$ -Isotyp-Kontrolle-FITC (Klon MOPC-21); polyklonaler Kaninchen- α BSA; Aprotinin; Dithiothreitol; D609; Ficoll 400; formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin; Genistein; Glyoxal; Hanks' balanced salts (HBSS; ohne Bicarbonat oder Phenolrot); Heringssperma-DNA; p-Hydroxyphenylessigsäure; Katalase; "Luminol" (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalalazinedion); Meerrettich-Peroxidase; Mepacrin; β -Mercaptoäthanol; Na-Ortho-Vanadat; Pentoxifyllin; Phorbol-Myristat-Acetat (PMA); phosphate-buffered saline (PBS); Polyvinylpyrrolidon; Propidiumjodid; Saponin sowie alle nicht extra aufgeführten Feinchemikalien und Lipidstandards

2.1.1 Zusammensetzung der gebräuchlichsten Pufferlösungen:

- Hanks'-Puffer (HBSS): 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,26 mM CaCl $_2$, 0,83 mM MgSO $_4$, 5,5 mM Glucose, 0,275 mM K $_2$ HPO $_4$, 0,44 mM KH $_2$ PO $_4$, 4,2 mM NaHCO $_3$, pH 7,4 (Hanks & Wallace 1949)

- Hanks'-HEPES-Puffer (Howard & Meyer 1984): 150 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4 , 4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1,2 mM CaCl_2 , 25 mM HEPES, 0,05% BSA, pH 7,15
- Krebs-Ringer-Puffer: 138 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1,5 mM Mg_2SO_4 , 5,5 mM Glucose, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , pH 7,3
- Krebs-HEPES-Puffer: 120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,3 mM CaCl_2 , 1,2 mM Mg_2SO_4 , 25 mM HEPES, 1,2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4 mit 0,1% BSA
- PBS-Puffer: 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,3
- Homogenisationspuffer für PKC-Bestimmung: 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 0,3% β -Mercaptoäthanol, 10 mM Benzamidin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin-Inhibitor, 20 $\mu\text{l/ml}$ Aprotinin, 20 $\mu\text{l/ml}$ "Complete™ Proteasen-Inhibitor-Cocktail"
- 2x-Lysepuffer für "Western blot": 250 mM TRIS-HCl, pH 7,0, 10% Glycerin, 4% SDS, 2% β -Mercaptoäthanol, 0,006% Bromphenolblau, 1 mM PMSF, 20 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 20 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin-Inhibitor, 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 5 mM DTT
- "HNTG"-Lysepuffer: 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 100 μM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin
- Elektrophorese-Puffer für "Western blot": 25 mM TRIS-HCl, pH 7,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
- "Western blotting"-Puffer: 20% Methanol, 40 mM Glycin, 0,0375% SDS, 0,5 M TRIS-HCl, pH 7,2
- "Blotto"-Puffer: PBS, 5% Magermilchpulver, 0,05% Tween 20, pH 7,3
- Guanidinthiocyanat-Lösung: 4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na_3 -Citrat, pH 7,0, 0,5% Na-Lauroylsarcosyl, 0,1 M β -Mercaptoäthanol
- RNA-"Denaturier-Puffer": 4 Volumeneinheiten (VE) deionisiertes Glyoxal, 12 VE DMSO, 2,5 VE 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,6, 1 VE 1% Ethidiumbromid

- RNA-Auftragpuffer: 50% Glycerin, 4‰ Bromphenolblau, 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,6
- 20 x SSC: 3 M Na-Acetat, 0,3 M Na₃-Citrat, pH 7,0
- (Vor)-Hybridisierungslösung: 2 αVE Hybridisierungsmixtur [12 x SSC, 1% Na-Lauroylsarcosyl, 2,5 x Denhardt-Lösung (je 1% Ficoll 400, Polyvinylpyrrolidon und BSA), 100 µg/ml Heringssperma-DNA], 1 VE deionisiertes Formamid
- Waschpuffer: 0,1 x SSC, 0,1% SDS oder 0,5 x SSC, 0,5% SDS
- Fixierlösung für F-Actin-Darstellung: 2 VE PBS-gepufferter 37%-iger Formaldehyd, je 1 VE L-α-Lysophosphatidylcholin (Stammlösung: 2 mg/ml in H₂O) und NBD-Phalloidin (Stammlösung: 3,3 µM in Methanol; 100 U/ml)

2.1.2 Verzeichnis der eingesetzten Inhibitoren mit Lösungsmitteln und Konzentrationen der Stammlösungen, soweit angewendet

<i>Substanz</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Stammlösung</i>
D609	Aceton/PBS	n.a. [#]
Diphenyljodonium-Jodid	DMF	5 mM
Genistein	EtOH	50 mg/ml
H-7	DMSO	20 mM
Herbimycin A	DMSO	1 mg/ml
LY294002	DMSO	50 mM
Mepacrin	PBS	jeweils frisch
Okadaic acid	EtOH/DMSO	10 µM/100 µM
<i>o</i> -Vanadat/Va-Hydroperoxid	PBS	jeweils frisch
Pentoxifyllin	PBS	jeweils frisch
Propranolol	Hepes/Hanks'	50 mM
R59 022	DMSO	10 mM
Staurosporin	DMSO	2 mM
U73122/U73343	Chloroform	2 mM
Wortmannin	DMSO	20 mM

[#] n.a.: nicht anwendbar; nach Portionieren in Aceton, jedesmal frisch in PBS

2.2 Zellen

2.2.1 Blutzellen

Die Blutgewinnung erfolgte bei gesunden Kontrollpersonen (Institutsangehörigen) und hämatologisch-gesunden Patienten des Sanitätszentrums der Akademie des Sanitäts- und Gesundheitswesens der Bundeswehr durch Venenpunktion mit Hilfe des "Vacutainer"-Systems [Fa. Becton Dickinson (BD), Heidelberg], überwiegend mit Li-Heparin, vereinzelt auch EDTA, als Antikoagulans. Typische Diagnosen bei den Patienten waren Sportverletzungen wie Bänderzerrung, Schädelprellung, Comotio cerebri, etc.. Die Präparation von Granulozyten (s. Kap. 2.5) erfolgte in der Regel innerhalb von 1 bis 3 Stunden nach Blutabnahme, wobei das Blut auf einem Kippmischer bei Raumtemperatur (RT) gelagert wurde.

2.2.2 HL-60 Zelllinie

Die HL-60 Zelllinie war ursprünglich von Herrn Prof. Dr. Grosse-Wilde, Direktor des Instituts für Immunologie der Universität Essen, Essen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Spätere Experimente wurden mit Zellen vorgenommen, die von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA bezogen worden waren. Die Zellen wachsen als Suspensionskultur. Exponentiell wachsende Kulturen wurden alle 3 - 4 Tage (zweimal pro Woche) in RPMI 1640-Medium, versehen mit 20% (v/v) Hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) und 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäure-Lösung, in 25-cm²-Kulturflaschen (5 ml Medium; Falcon; BD) subkultiviert. Die Kultivierung erfolgte ohne Zusatz von Antibiotika bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Anteil von 5%, wobei sich der pH-Wert durch Zusatz von 2 g/l NaHCO₃ im Medium auf 7,4 einstellt.

Für Experimente wurden am Tag 0 (d 0) exponentiell asynchron wachsende Kulturen pelletiert (300 x g, 5 min, RT), in frischem Kulturmedium resuspendiert und mit einer Zelldichte von 1 x 10⁵ Zellen/ml in neue Kulturen überführt (25 ml Medium in 75-cm²-Kulturflaschen), ggf. anschließend bestrahlt (s. Kap. 2.3), und durch Zugabe von 1,25% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) ins Medium die Differenzierung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen induziert. Zur Vermeidung möglicher radioprotektiver Effekte von DMSO (Moulder et al. 1978) erfolgte die DMSO-Zugabe jeweils erst unmittelbar nach der Strahlenexposition der Zellen. Die Untersuchungen erfolgten von d 0 bis d 7 nach Induktion und/oder Bestrahlung.

2.3 Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer speziellen (Tier)-Bestrahlungsanlage (Isovolt 320/10; Fa. Seifert, Ahrensburg) mit 240 kV Röntgenstrahlen mit Filterung durch 3 mm Beryllium. Die Dosisleistung betrug in einem Abstand von ca. 40 cm zwischen dem Focus der Röhre und der Kultur ca. 1 Gy/min bei einem Röhrenstrom von 13 mA. Die Dosimetrie wurde mit einem Duplex-Dosimeter (SN4; Fa. PTW, Freiburg) mit einem Sr-90-Präparat als Referenzstrahler vorgenommen.

2.4 Wachstumskurve und Überleben nach Bestrahlung ("Klonierungstest")

Die Wachstumskurve wurde mittels mikroskopischer Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer oder unter Verwendung eines Partikelzählgerätes (Modell ZM; Coulter, Krefeld) erstellt.

Zum Klonierungstest wurden die HL-60 Zellen nach einem Waschschrift (300 x g; 5 min, RT) mit Medium in frischem RPMI-Medium bestrahlt und in einem semi-soliden Medium bestehend aus 0,6% Agar (Difco, Detroit, MI, USA) in 10 Teilen destilliertem Wasser, 6 Teilen RPMI-Medium und 4 Teilen FKS ausgesäht und 7 Tage bei 37 °C wie oben (Kap. 2.2.2) inkubiert. Die Zellklone mit mehr als 50 Zellen wurden 30 min in absolutem Äthanol fixiert und mit einer 0,25% Kristallviolett-Lösung (in Wasser) für 10 min angefärbt. Bei unbestrahlten Zellen betrug die Ausbeute an Kolonie-bildenden Zellen ("plating efficiency") ca. 80%. Sie wurde bei jedem Experiment mitbestimmt und gleich 100% im Vergleich zu der bestrahlten Kulturen gesetzt.

2.5 Präparation von Granulozyten aus Vollblut

Zur Präparation von Granulozyten aus Vollblut wurden ca. 3 ml Lymphozyten-Separations-Medium (LSM) mit einer Dichte von 1,077 g/ml in 15 ml-Falcon-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit bis zu 5 ml unverdünntem Blut überschichtet. Die Zentrifugation des Stufengradienten erfolgte für 10 Minuten (min) bei 900 x g und RT ("Rotanta RP"-Kühlzentrifuge; Fa. Hettich, Tuttlingen). Danach wurden nacheinander Plasma, mononukleäre Zellen sowie die LSM-Schicht sorgfältig entfernt und das Erythrozytensediment mit den Granulozyten aufgewirbelt. Die Zellsuspension wurde mit dem mindestens 10-fachen Volumen hypotone Ammoniumchlorid-Lösung (0,17 M NH_4Cl mit 10 mM KHCO_3 und 0,1 mM $\text{Na}_4\text{-EDTA}$; pH 7,3; BD-Protokoll in Anlehnung an Wymann et al. 1987a) versetzt und bis zur Erythrozytenlyse (erkenntlich am Farbumschlag nach "lackfarben" nach 5 bis 10 min) bei RT auf einem Kippmischer inkubiert. Alle

nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Granulozyten wurden dann pelletiert (400 x g, 10 min, 4 °C), in kalter Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; pH 7,3) sorgfältig resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Das dann weitgehend Erythrozyten-freie Granulozytenpellet wurde erneut vorsichtig in PBS resuspendiert und Aliquots zur Ermittlung der Zellausbeute sowie zur Kontrolle der Vitalität (s. Kap. 2.6) entnommen. Ca. 95% der so präparierten Zellen waren (neutrophile) Granulozyten.

2.6 Vitalitätstestung

Aliquots isolierter Granulozyten oder von HL-60 Zellen (nach Waschen in PBS) wurden mit 7,5 μM Propidiumjodid (Stammlsg.: 75 μM in PBS) kurze Zeit (2-3 min) inkubiert und durchflußzytometrisch (s. Kap. 2.9) der Anteil toter Zellen aufgrund ihrer "Rotfluoreszenz" ("red is dead"; Krishan 1975) identifiziert. Die Vitalität betrug regelmäßig > 95%.

2.7 Funktionelle Untersuchungen

2.7.1 Messung der "respiratory burst"-Reaktion

Die Messung der "respiratory burst"-Funktion von Granulozyten und HL-60 Zellen erfolgte mit drei verschiedenen Methoden, die unterschiedliche Aussagen erlauben. Die durchflußzytometrische Analyse (s. Kap. 2.9) erfaßt mit Hilfe von Indikatormolekülen (s. Kap. 2.7.1.1), die nach Oxidation zur Fluoreszenz angeregt werden können, nur zellgebundene Fluoreszenzsignale einzelner Zellen. Etablierte Indikatoren sind hierbei die Farbstoffe Dichlorfluorescein (DCFH) und Dihydrorhodamin (DHR) 123. Zur Spezifität der Verbindungen für bestimmte Sauerstoffspezies wird auf die Diskussion (Kap. 4.2.1) verwiesen. Die relative, akkumulierte Fluoreszenzintensität der individuellen Zelle ist ein Maß für deren Reaktivität auf einen Stimulus. Die Einzelzellmessung ermöglicht die Identifikation von Subpopulationen innerhalb einer Zellpopulation.

Dagegen liefert der chemoluminometrische Ansatz (mit dem Indikatormolekül 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedion; "Luminol") das Integral der Lichtsignale aller Zellen in der Küvette, kann somit also keine Subpopulationen von Zellen identifizieren. Zu den Reaktionsmechanismen der Lichtentstehung aus Luminol wird ebenfalls auf Kap. 4.2.1 verwiesen. Da Luminol die Plasmamembran der Zellen passieren kann, wird mit Chemoluminometrie und Luminol als Indikator sowohl intra- wie auch extrazelluläre Lichtproduktion bestimmt. Die im Takt von < 1 min wiederholten Messungen desselben

Ansatzes ermöglichen eine exakte Aufzeichnung der Kinetik der Lichtproduktion (vgl. Abb. 26b).

Der Nitroblau-Tetrazolium (NBT)-Reduktionstest mißt mit lichtmikroskopischer Auswertung die intrazelluläre Bildung eines purpurbauen Präzipitats aus Formazan-Salzen als Ausdruck der Reaktion von Superoxidanionen mit dem NBT-Reagenz (Breitman et al. 1980).

2.7.1.1 Durchflußzytometrischer Test

Der durchflußzytometrische Test benutzte DHR 123 als Indikatormolekül für die Produktion oxidativer Agenzien. Ein typischer Ansatz (Vol. 1 ml) bestand aus 1×10^6 Zellen in PBS mit 5 mM Glucose bei Stimulation mit Phorbol ester (PMA) oder in Hanks'-Puffer bei Stimulation mit f-MLP bzw. in Krebs-Ringer-Puffer bei Stimulation mit Immunkomplexen. Die Beladung der Zellen mit DHR 123 (40 μ M; Stammlsg.: 40 mM in DMF) erfolgte für 15 min bei 37 °C. Nach Messung der Ausgangs-Fluoreszenzintensität ($T = 0$ min) kamen folgende Stimuli zur Anwendung, wobei der f-MLP-Stimulation - wenn nicht ausdrücklich herausgestellt - jeweils eine Vorbehandlung mit Cytochalasin B (CytB; 10 μ M; Stammlsg.: 10 mM in DMSO) für ca. 2 - 5 min vorausging:

- PMA (100 ng/ml; Stammlsg.: 1 mg/ml in DMF) oder
- f-MLP (1 μ M; Stammlsg.: 10 mM in DMSO) oder
- Immunkomplexe (120 μ g/ml; Stammkonzentration: 6 mg/ml in PBS mit 0,1% Na-Azid).

Zu verschiedenen Zeitpunkten (bis 1 h) nach Stimulation wurden erneut die Fluoreszenzintensitäten gemessen.

Die Stimulation der RB-Reaktion über Fc γ R erfolgte auch durch Beladen der Zellen (in Hanks'-Puffer mit 50 μ M Na-Orthovanadat) mit Immunkomplexen (120 μ g/ml) auf Eis für 30 min mit zwischenzeitlicher Zugabe von DHR 15 min vor der $T = 0$ -Messung. Nichtgebundenes Protein wurde mit kaltem PBS ausgewaschen (400 x g, 5 min, 4 °C) bevor die Zellen zur Messung des Ausgangswertes erwärmt wurden (5 min; 37 °C). Bei vorheriger Beladung der Zellen mit anti-Fc γ R-Antikörpern aus der Maus erfolgte anschließend die Zugabe des "Proteinvernetzers" (= "linker") in Form des Ziege anti-Maus-IgG-Antikörpers (50 μ g/ml).

Beim erstmaligen Einsatz unbekannter Inhibitoren wurde der Ansatz nach der Messung des Ausgangswertes halbiert und die eine Hälfte mit dem Stimulus/"linker" versetzt, während die andere Hälfte das entsprechende Volumen an Puffer erhielt ("Scheinstimulation"). Außerdem erfolgte hier eine weitere Vitalitätskontrolle durch Zugabe von Propidiumjodid

in den stimulierten Ansatz mit erneuter Bestimmung des Anteils toter Zellen nach erfolgter "burst"-Messung.

2.7.1.2 Chemolumineszenz-Assay

Der Chemolumineszenz (CL)-Ansatz (1 ml) bestand aus 400 µl Krebs-HEPES-Puffer mit 0,1% BSA, pH 7,4, 100 µl Zellsuspension ($1-10 \times 10^5$ Zellen), 100 µl Meerrettich-Peroxidase (10 Einheiten/ml) und 200 µl Luminol (10 µM; Stammlsg.: 10 mM in DMSO). Nach Vorinkubation dieses Ansatzes bei 37 °C für 15 min erfolgte die Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion (durch Zugabe über Dispensoren; Modell SVG; alle Geräte von Bio-Orbit, LKB Wallac; Fa. Colora, Lorch/Württemberg) von 200 µl Stimulus [entweder PMA oder f-MLP; Konzentrationen wie oben; die CytB-Zugabe erfolgte hier systembedingt zusammen mit f-MLP]. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte in einem Luminometer (Modell 1251; Bio-Orbit). Die Lichtproduktion wurde über einen Zeitraum bis 60 min nach Stimuluszugabe aufgezeichnet. Das Integral der CL über 20 min, soweit notwendig nach Abzug des jeweiligen Kontrollwertes, wurde bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des "Phagocytosis Assays" der Multiuse-Software, Versionen 1.08 bzw. 2.01 (Bio-Orbit).

2.7.1.3 Nitroblau-Tetrazolium-Reduktionstest

Zum NBT-Reduktionstest wurden gleiche Volumina einer Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) mit einer Lösung aus 0,2% NBT und 100 ng PMA/ml bei 37 °C für 20 min inkubiert und unter wenigstens 200 Zellen der Anteil an Zellen mit purpurblauem Präzipitat (als NBT^+ -Zellen) mittels Lichtmikroskopie in einem Hämozytometer ausgezählt.

2.7.1.4 Herstellung von Immunkomplexen

Die Präparation von unlöslichen Immunkomplexen erfolgte gemäß Brunkhorst et al. (1991). Dazu wurden - auf Gewichtsbasis - 1 Teil Rinderserumalbumin (BSA) in Wasser gelöst und mit 10 Teilen anti-BSA-Antikörpern (polyklonal aus dem Kaninchen; nach Rekonstitution in PBS, pH 7,0) zunächst 2 h bei 37 °C und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Immunkomplex-Präzipitat (5 min, $14.000 \times g$) wurde dreimal mit PBS, pH 7,3 gewaschen, danach in PBS aufgenommen. Die Protein-Bestimmung erfolgte gegen BSA als Referenzsubstanz mit Hilfe eines Kits (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad, München), der auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung durch Bindung an Protein von 465 nm nach 595 nm beruht.

Das Stammkonzentrat wurde auf 6 mg Immunkomplexe/ml in PBS mit 0,1% Na-Azid eingestellt und bei 4 °C gelagert.

2.7.2 Phagozytose-Test

Der Phagozytose-Test wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit ("PhagoTest®"; ORPEGEN, Heidelberg) durchgeführt. Er beinhaltet als wesentliche Komponente fixierte, mit Humanserum opsonierte, FITC-konjugierte E. coli-Bakterien. HL-60 Zellen wurden dazu in frischem Medium auf eine Zelldichte von 5×10^6 /ml eingestellt, davon 50 µl ($2,5 \times 10^5$ Zellen) in die Vertiefungen ("well") einer 96-well Mikrotiter-Platte mit Rundboden (Greiner, Nürtingen) gegeben und mit jeweils 10 µl E. coli-Suspension bis zu 60 min bei 37 °C inkubiert. Auf Eis verbliebene Ansätze mit Bakterien dienten als Kontrollen. Der Phagozytosevorgang wurde durch Transfer der Ansätze bei 37 °C zurück auf Eis angehalten und die Fluoreszenz adhärenter, aber nicht-phagozytierter Bakterien durch Inkubation mit der "Quench"-Lösung des Kits (100 µl/Ansatz) unterdrückt. Nach Waschen der Zellen mit der Waschlösung des Kits wurden die Zellen in 1,5% Formaldehyd (in PBS) für 5 min bei RT fixiert, erneut gewaschen und in der "DNA-Färbelösung" der Kits (Propidiumjodid) für die durchflußzytometrische Analyse (s. Kap. 2.9) resuspendiert. Der Phagozytose-Ansatz mit Vollblut wurde gemäß den Angaben des Herstellers des Kits vorgenommen. Die notwendige Lyse der Erythrozyten mit dem Lysereagenz des Kits erfolgte in Abwandlung der vorherigen Methode nach dem "Quench"/Waschschritt, gefolgt von einem weiteren Waschschritt nach der Lyse.

2.8 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung von HL-60 Zellen hinsichtlich der Expression von Oberflächenantigenen (CD-Epitope und Formylpeptid-Rezeptor) erfolgte zur Bestimmung ihres Differenzierungsgrades nach Induktion der Differenzierung mit DMSO. Die Darstellbarkeit von Phosphotyrosinresten an Proteinen im Zellinnern diente als relativ grobes Maß für erfolgte Zellaktivierung, die mit Proteintyrosinkinase-Aktivität einhergeht.

2.8.1 Expression von CD-Antigenen

Zur Immunphänotypisierung hinsichtlich der Expression von CD-Antigenen wurden die HL-60 Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen (400 x g; 5 min, 4 °C) und die Zellkonzentration mit PBS auf 4×10^6 Zellen/ml eingestellt. 25 µl Zellsuspension (10^5 Zellen)

wurden in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiter-Platte gegeben und jeweils 5 µl der direkt-konjugierten monoklonalen Antikörper (mAK) hinzugefügt. Nach Inkubation für 30 min bei Dunkelheit auf Eis wurde der Ansatz mit 150 µl PBS (mit 0,1% Na-Azid; "PBS-Azid") gewaschen und die Zellen in 1,5%-iger, PBS-gepufferter Formaldehyd-Lösung 5 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen (100 µl PBS-Azid) erfolgte die Aufnahme der Zellen in Trägerlösung für die Durchflußzytometrie ("FACSFlow™", BD) zur Lagerung bis zur Analyse innerhalb von 24 h bei 4 °C. Die Negativ-/Isotypenkontrolle bestand aus mAK gegen das Hämocyanin der Napfschnecke, sowohl als FITC (IgG₁)- als auch als PE-Konjugat (IgG_{2a}; SimulTest Control™; BD) bzw. aus IgG₁-FITC und -PE; Medac).

Die Immunphänotypisierung der Granulozyten aus Vollblut mit der Lyse der Erythrozyten nach der Markierung der Zellen erfolgte gemäß der Anleitung des "SimulTest Immune Monitoring Kits™" (BD; Kaffenberger et al. 1996).

2.8.2 Expression des Formylpeptid-Rezeptors (FPR)

Nach zweimaligem Waschen (s.o.) wurden die HL-60 Zellen in kaltem HBSS auf 10⁶ Zellen/ml eingestellt und mit 100 nM f-MLP-analogem Hexapeptid (f-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys)-FITC (Stammlsg.: 1 mg/ml in DMF) für 30 min bei Dunkelheit auf Eis inkubiert. Kontrollansätze enthielten Zellen mit den entsprechenden Volumina Lösungsmittel bzw. f-MLP. Nach Waschen in HBSS erfolgte sofort die durchflußzytometrische Analyse (s. Kap. 2.9). Um die Internalisation des FPR zu verhindern (Janeczke et al. 1989), erfolgten die ersten Untersuchungen in Anwesenheit von 0,1% CytB (Sirak et al. 1990). Eigene Vergleiche zeigten jedoch, daß bei strikter Durchführung des Ansatzes bei 4 °C kein CytB-Effekt nachweisbar ist, so daß in späteren Versuchen darauf verzichtet wurde.

2.8.3 Markierung von intrazellulären Phosphotyrosinresten an Proteinen

Die Darstellung intrazellulärer Phosphorylierungen an Tyrosinresten erfolgte gemäß Farahi Far et al. (1994). Frische Vanadiumhydroperoxid-Lösung ("Pervanadat"; Inhibitor von Protein-Tyrosin-Phosphatasen; siehe Kap. 3.2.4) wurde dazu durch Oxidation von 5 mM Na₃VO₄ mit 1 mM H₂O₂ für 15 min bei RT mit nachfolgender Katalase-Behandlung (200 µg/ml, 15 min, RT; zur Entfernung von überschüssigem H₂O₂) hergestellt und innerhalb von 2 h nach Ansetzen verwendet (s. dazu Fantus et al. 1989). Nach Auslösen der "respiratory burst"-Reaktion (siehe Kap. 2.7.1) in Anwesenheit von 200 µM Pervanadat (Konzentration bezogen auf die Konzentration des eingesetzten Ortho-Vanadats) wurden die Zellen in Eiswasser abgekühlt (2 min) und pelletiert (400 x g; 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 1% Formaldehyd (in PBS, pH 7,2) für 30 min bei 4 °C fixiert und nach Zentrifugation wie oben für 10 min mit 0,05% Saponin (in PBS) bei RT permeabilisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit

0,1% BSA (in PBS, pH 7,6 mit 0,1% Tween 20) für 30 min auf Eis blockiert. Die Darstellung von Tyrosinphosphorylierungen (PY) an Proteinen erfolgte mit einem mAK gegen PY (α PY-FITC, Klon PT-66) unter saturierenden Bedingungen (20 μ g/ml) für 30 min auf Eis im Dunkeln im Vergleich gegen eine FITC-Isotyp- (IgG₁)-Kontrolle (MOPC-21) nach Verdünnung in PBS mit 0,1% BSA und 0,1% NaN₃. Danach erfolgte ein Waschgang in PBS mit BSA und NaN₃ wie oben.

2.8.4 Darstellung des filamentären Actins des Zytoskeletts

Zur Darstellung des filamentären Anteils des Actins (F-Actin) des Zytoskeletts mittels NBD-Phalloidin nach Barak et al. (1980) wurden 1×10^6 HL-60 Zellen in 800 μ l Hanks'-HEPES-Puffer (nach Howard & Meyer 1984; s. Kap. 2.1.1) aufgenommen und mit 200 μ l Fixierlösung (s. Kap. 2.1.1) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (350 x g, 5 min, RT) wurden die Zellen in Hanks'-HEPES-Puffer resuspendiert (5 ml), erneut gewaschen (s.o.) und in 500 μ l Hanks'-HEPES-Puffer zur durchflußzytometrischen Analyse (s. Kap. 2.9) innerhalb einer Stunde aufgenommen. Als Negativkontrolle diente eine Fixierlösung, die anstelle von NBD-Phalloidin das Lösungsmittel Methanol enthielt. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit von Meßserien untereinander wurde hierbei das Durchflußzytometer (s. Kap. 2.9) mit Hilfe von "grün"-fluoreszierenden Kalibrierkügelchen ("beads"; 6,1 μ m Durchmesser; Polysciences, Eppelheim) vor jeder Meßreihe dadurch geeicht, daß die mittlere Fluoreszenzintensität der "beads" immer auf eine bestimmte Kanalzahl eingestellt wurde.

2.9 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein Meßverfahren zur simultanen Bestimmung mehrerer Zellparameter, die durch Streulicht- oder Fluoreszenzsignale definiert sind. Die Signale für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht stellen relative Maße für Zelldurchmesser ("Größe") bzw. -granularität dar. Je nach fluoreszierendem Agens können Fluoreszenzsignale für DNA-Gehalt der Zellen, für die Bindung eines Fluorochrom-konjugierten Antikörpers an ein intrazelluläres (s. Kap. 2.8.3 und 2.8.4) oder Oberflächen-Epitop (s. Kap. 2.8.1 und 2.8.2) oder für eine zelluläre Reaktion wie der Bildung von Sauerstoffradikalen ("respiratory burst"; s. Kap. 2.7.1.1) stehen.

Alle durchflußzytometrischen Analysen wurden an einem FACScan-Gerät und dem CONSORT 30 Datenanalysesystem (FACScan Research Software) auf einem Hewlett Packard Computer (alle Komponenten von BD) vorgenommen. Das Gerät ist mit einem 15 mW-Argon-Laser ausgestattet, dessen einzig verwertbare Emissionswellenlänge bei 488

nm liegt. Linear verstärkte Vorwärts- und Seitwärts-Streulichtsignale wurden zur positiven Identifikation der Zellpopulationen und zur Ausgrenzung von Zelltrümmern (elektronisches "gating") benutzt. Fluoreszenzsignale wurden auf einer logarithmischen Achse über 4 Dekaden (1 - 10.000) dargestellt, wobei die "Grün"-Fluoreszenz (des DHR 123, des Fluoresceins bzw. des FITC und des NBD-Phalloidins) durch ein Bandfilter (530 ± 15 nm) definiert ist, die "Orange"-Fluoreszenz des PE durch ein 2. Bandfilter (585 ± 21 nm) und die "Rot"-Fluoreszenz des Propidiumjodids durch ein sog. "long-pass"-Filter (> 650 nm). Es wurden Streulicht- und Fluoreszenzsignale von 1.000 bis 5.000 Zellen/Probe in "list mode" aufgezeichnet und in Form von 2-parametrischen "dot plot"- und/oder 1-parametrischen Histogramm-Darstellungen (s. Abb. 15) ausgewertet.

Die von der Software auf eine lineare (lin) Achse von 1024 Kanälen berechneten mittleren Fluoreszenzintensitäten der Verteilungen wurden mit Hilfe der Formel $Y_{(\log)} = 1,009035022^{X_{(\text{lin})}}$ auf die logarithmische (log) Achse umgerechnet (Kaffenberger et al. 1992; Rohr & Kaffenberger 1993). Die Ergebnisse der Phagozytose-Aktivität, der FPR-Expression oder der Expression von CD-Antigenen sind als Prozentzahl Phagozytose-, Hexapeptid- oder CD-positiver Zellen angegeben, wobei der Anteil falsch-positiver Zellen der Kontrollansätze (Eis-Kontrollen der Phagozytose; ohne Hexapeptid bzw. mit irrelevantem Antikörper/Isotyp-Kontrolle inkubiert) subtrahiert wurde. Die Formylpeptid-Rezeptordichten, die "respiratory burst"-Reaktivität und die F-Actin-Gehalte sind als Kanalzahl der mittleren Fluoreszenzintensität nach Umrechnung auf die logarithmische Achse angegeben. Die "respiratory burst"-Reaktivität wurde z.T. auch als "Faktor" (vgl. Abb. 16) nach Berücksichtigung des unstimulierten Ausgangswertes ($T = 0$ min) durch die Anwendung folgender Formel ausgedrückt:

$$\text{"Faktor"} = \frac{\text{Mittl. Kanalzahl}_{(T = x \text{ min})} - \text{Mittl. Kanalzahl}_{(T = 0 \text{ min})}}{\text{Mittl. Kanalzahl}_{(T = 0 \text{ min})}}$$

2.10 RNA-Isolierung und "Northern blot"

Das "Northern blot"-Verfahren dient der Untersuchung von Veränderungen der transkriptionellen Aktivität von Zellen für ein bestimmtes Gen durch Bestimmung des relativen Gehaltes der entsprechenden mRNA.

Die RNA-Gewinnung erfolgte nach Chomczynski & Sacchi (1987). Dazu wurden ca. 100×10^6 HL-60 Zellen pelletiert und zu ca. 300 µl Zellpellet nacheinander 700 µl Guanidin-thiocyanat-Lösung (s. Kap. 2.1.1), 70 µl 2 M $\text{Na}_3\text{-Acetat}$, pH 4,0, 700 µl wassergesättigte Phenol-Lösung und 140 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1, v/v) hinzugefügt. Der Zellaufschluß wurde homogenisiert und 30 min auf Eis aufbewahrt. Nach Zentrifugation

(18.000 x g; 20 min, 4 °C) wurde die wässrige Phase entnommen und im Verhältnis 1:2 mit absolutem Isopropanol gemischt. Nach Lagerung (1 h bei -70 °C oder über Nacht bei -20 °C) wurde die RNA pelletiert (Zentrifugation wie oben), mit 80%-igem Äthanol gewaschen, mit Hilfe einer Evaporations-Kühlzentrifuge ("UNIVAPO UVC 150 H", UniEquip, Martinsried) getrocknet und zur photometrischen Quantifizierung der RNA bei 260 nm in Wasser gelöst.

Zur RNA-Elektrophorese wurden 1% Agarose-Gele in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,6 gegossen (Casting Tray; Pharmacia); 10 µg RNA wurden in "Denaturier-Puffer" (s. Kap. 2.1.1) aufgenommen, durch Erwärmen (50 °C, 30 min) denaturiert und ca. 90 min bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde wie üblich über ca. 12 h mit 20 x SSC auf Nylonmembranen ("Hybond™ N"; Amersham, Braunschweig) "geblottet" ("Northern blot") und durch Erhitzen für 1 h bei 80 °C auf der Membran fixiert. Die Vorhybridisierung (Lösung: s. Kap. 2.1.1) der Membran erfolgte für > 4 h bei 42 °C, die Hybridisierung mit α-P-32-dCTP-markiertem (222 TBq/mmol) 1,1-Kilobasen-Segment des Exons 4 einer human β-Actin-cDNA (ATCC) (0,5 bis 0,8 x 10⁶ cpm/ml Vorhybridisier-Lösung) für 12 bis 24 h bei 42 °C. Die in vitro-Markierung der Nukleotide wurde mit Hilfe des "Megaprime™ DNA Labelling Systems" (Amersham) entsprechend der spezifischen Anleitung des Herstellers und unter Verwendung von "random nonamer primern" vorgenommen. Nichteingebaute Nukleotide wurden über Gelfiltration ("Quick-Spin™-Säulen, Sepharose G50) entfernt. Die zweimal mit Waschpuffer (s. Kap. 2.1.1) gespülte Membran wurde zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMat™ AR 50) in einer Filmkassette ("Hyperscreen™") mit "Hyperscreen™"-Verstärkerfolie (Amersham) bei -70 °C exponiert, danach der Film entwickelt und der Schwärzungsgrad der β-Actin-mRNA-Banden Laser-densitometrisch quantifiziert (Pharmacia LKB, Freiburg; Modell Ultrosan XL, Software: GelScan XL, Version 2.1, auf einem Olivetti-Computer M 28). Der relative mRNA-Gehalt wurde unter Berücksichtigung des relativen 18S-rRNA-Gehaltes der Zellen (nach Laser-Densitometrie der Ethidiumbromid-gefärbten rRNA) errechnet.

2.11 Immunpräzipitation und "Western blot" von Proteinen

Das "Western blot"-Verfahren bestimmt den relativen Gehalt eines Proteins oder von Proteinen mit gemeinsamen Charakteristika (z.B. Vorhandensein von phosphorylierten Tyrosinresten in Proteinen; vgl. Kap. 2.8.3) eines Zellextraktes durch Markierung der geelektrophoretisch aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antikörpern. Der exakte Nachweis des Vorliegens eines bestimmten Proteins erfolgt über seine relative geelektrophoretische Mobilität (Molekulargewicht) in Verbindung mit der Detektion durch den Antikörper, dessen Bindung an das Protein wiederum chemoluminometrisch durch die Schwärzung eines Films (s.u.) bestimmt wird. In das "Western blot"-Verfahren können

entweder Gesamtproteinextrakte oder Proteine nach deren Anreicherung durch Ausfällung aus dem Gesamtaufschluß mittels spezifischer Antikörper ("Immunpräzipitation"; s.u.) eingesetzt werden.

HL-60 Zellen oder Granulozyten ($5-40 \times 10^6$) wurden mit eiskaltem PBS, pH 7,3 gewaschen, resuspendiert, im gleichen Volumen (800 μ l) "HNTG"-Lysepuffer (s. Kap. 2.1.1) aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen in eine 1 ml-Spritze mit G20-Kanüle homogenisiert. Zur Immunpräzipitation wurden die Lysate mit 40 μ l vorgequollener Protein A-Sepharose versetzt und 15 min bei 4 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation ($13.000 \times g$, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 10 μ l (= 1 μ g) spezifischem Primärantikörper (monoklonal oder polyklonal; Santa Cruz) versetzt (1 h bei 4 °C) und nach Zugabe von 20 μ l Protein A-Sepharose weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das Pellet zweimal mit HNTG-Lysepuffer gewaschen und in 2x-Lysepuffer für "Western blot" (s. Kap. 2.1.1) aufgenommen.

Die Proteine oder Immunpräzipitate aus gleicher Anzahl aufgeschlossener Zellen wurden denaturiert (5 min, 100 °C) und in Vertikalelektrophorese (LKB2001 Vertical-Elektrophorese-Kammer) in denaturierendem 10% Polyacrylamid-/0,85% SDS-Gel mit 3,6%-igem Polyacrylamid-Obergel aufgetrennt (200 mA; Elektrophorese-Puffer: s. Kap. 2.1.1). Nach elektrischem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel; 3 h bei 0,25 mA/cm²; "Western blotting"-Puffer: s. Kap. 2.1.1) wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran mit 5% Magermilchpulver in PBS über Nacht bei 4 °C geblockt, danach 30 min bei RT in obiger Lösung mit 0,05% Tween 20 inkubiert ("Blotto"-Puffer, s. Kap. 2.1.1). Die Detektion spezifischer Proteine erfolgte durch Inkubation der Membranen mit geeigneten spezifischen Primärantikörpern (mono- oder polyklonal; nach 1:50-Verdünnung in "Blotto"-Puffer) für 45 min bei RT in "Blotto"-Puffer. Nach zwei Waschschritten (2 x 7 min in PBS mit 0,05% Tween 20) folgte die Inkubation der Membranen für 30 min mit geeigneten (Ziege-anti-Kaninchen- oder anti-Maus-IgG) Peroxidase-Konjugaten sekundärer Antikörpern (1:1.000 bis 1:1.500 verdünnt; Santa Cruz). Nach erneutem Waschen (2 x 5 min in PBS mit 0,05% Tween 20; 1 x mit PBS) wurde das (Luminol)-verstärkte Chemolumineszenz-Verfahren ("enhanced chemiluminescence", ECL; Amersham) zum Nachweis der relativen Proteinmengen auf der Membran durch Exposition von Lumineszenzfilmen ("Hyperfilm™-ECL"; Amersham) eingesetzt. Dazu wurden die ECL-Reagenzien A und B (Luminol und H₂O₂) zu gleichen Teilen gemischt und in einem Volumen von 125 μ l/cm² Membran verwendet. Die Expositionszeiten betrugen 10 sec bis 30 min. Die Spezifität des Nachweises wurde durch Vorinkubation des Primärantikörpers mit entsprechenden Kontrollpeptiden und der damit verbundenen Nicht-Detektion des spezifischen Signals geprüft. Die Molekulargewichtsmarker-Proteine des "Rainbow™"-Cocktails dienten zur Abschätzung der Molekulargewichte der detektierten Proteine.

2.12 Proteinkinase C (PKC)-Aktivitätsassay

Da PKC-Aktivität eine besondere Bedeutung bei der Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase beigemessen wird (vgl. Kap. 1.1.4), war es notwendig die Enzymaktivität im Rahmen dieser Studie und besonders nach Bestrahlung der Zellen zu untersuchen.

Die Bestimmung von PKC-Aktivität erfolgte mit Hilfe des "PKC-Enzym Assays" der Fa. Amersham, exakt gemäß den Anweisungen der Herstellerfirma. Er beruht auf der PKC-katalysierten Übertragung der P-32-markierten γ -Phosphatgruppe von ATP auf den Threonin-Rest eines PKC-spezifischen Peptids unter Reaktionsbedingungen, welche die maximale Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger sowie Ca^{2+} -unabhängiger PKC-Isoenzyme garantieren sollen. Die Lipidmischung der "component mixture" (s.u.) enthält dazu eine Dispersion aus L- α -Phosphatidyl-L-serin und PMA.

Bei der Versuchsdurchführung wurden 5 bis 50×10^6 Zellen (in PBS gewaschene, isolierte Granulozyten oder HL-60 Zellen nach unterschiedlichen Zeiten der DMSO-Behandlung und/oder Bestrahlung) mit oder ohne PMA-Stimulation (10 min bei 37 °C) in 1 ml eiskaltem Homogenisationspuffer (s. Kap. 2.1.1) aufgenommen und durch zweimalige Ultraschallbehandlung (jeweils 10 sec auf Eis mit zwischenzeitlichem Kühlen) aufgeschlossen. Zur Abtrennung größerer Zellbruchstücke/Zellkerne erfolgte ein Zentrifugationsschritt ($5.000 \times g$; 5 min bei 4 °C). Ein Aliquot des Aufschlusses wurde direkt gemessen ("Gesamtaktivität"), während der größere Rest durch Ultrazentrifugation (Beckman Ultrazentrifuge Modell L5-50, Rotor SW 60Ti; Beckman, München; $100.000 \times g$, 1 h bei 4 °C) in eine zytosolische ("Überstand") und eine Membranfraktion ("Pellet") getrennt wurde. Das Pellet wurde erneut in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und in einem Handhomogenisator homogenisiert.

Der Reaktionsansatz (75 μl) besteht aus je 25 μl "component mixture" (zusammengesetzt aus gleichen Teilen Ca-Puffer, Lipide, Peptid-Puffer und DTT-Puffer des Kits), Mg^{2+} -P-32-ATP-Puffer (10 $\mu\text{Ci/ml}$ = 370 kBq/ml, spez. Aktivität: 148 TBq/mmol) und Zelllysat. Nach Inkubation des Ansatzes bei 25 °C für 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl "Stop-Reagenz" beendet und 125 μl des Ansatzes auf ein "Bindungspapier" des Kits überführt. Nach zweimaligem Waschen (je 10 min) mit pro Papier jeweils 10 ml 5% Essigsäure wurden die Filterpapiere in Szintillationsgefäße transferiert und die Radioaktivität mit "Rotiszint® eco plus" (Roth, Karlsruhe) als Szintillationsflüssigkeit bestimmt (Beckman Flüssigkeitsszintillationszähler, Modell LS 3801; Beckman). Die Bestimmungen wurden z.T. zweifach vorgenommen und Ansätze ohne Zellaufschluß, aber mit dem entsprechenden Volumen Lysepuffer, dienten als Kontrollen.

2.13 Lipidextraktion

Lipid-"2nd messenger" sind die physiologischen Aktivatoren von PKC-Isoenzymen (vgl. Kap. 1.1.4). Zur Quantifizierung der möglichen Veränderungen von Lipiden nach Bestrahlung und/oder Stimulation der Zellen wurde zunächst eine Extraktion der Gesamtlipide vorgenommen. Nach Einführen einer chromophoren Gruppe zur Detektion der Lipide im UV-Bereich erfolgte die Analyse dieser Proben mit dem hochsensitiven Meßverfahren der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie (HPLC; s. Kap. 2.14).

Zur Lipidextraktion wurden die in PBS gewaschenen Zellen in Hanks'-Puffer überführt (7 x 10⁶/ml), bestrahlt oder scheinbestrahlt und mit f-MLP ($\pm$ CytB) stimuliert. Pro ml Zellsuspension wurden je 2 ml Chloroform und Methanol zugegeben und 1 min durch kräftiges Schütteln homogenisiert. Nach Filtration (Büchnertrichter) wurde das Filtrat zentrifugiert (25.000 x g; 15 min, 4 °C; Sorvall Zentrifuge, Modell RC, SS-34 Rotor), die Chloroform-Phase entnommen und mittels eines Rotationsverdampfers ("Rotavapor R"; Fa. Büchi, Flawil, Schweiz) unter Vermeidung höherer Kolbentemperaturen als 30 °C eingengt. Die getrockneten Lipide wurden in 500 μ l Benzolgemisch (mit 5 mg Benzoesäureanhydrid und 2,5 mg 4-(Dimethylamino)-Pyridin) gelöst und für 3 h bei RT inkubiert, danach die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l konzentriertem Ammoniak für 15 min bei RT gestoppt. Eine erneute Lipidextraktion erfolgte mit 2,5 ml Acetonitril, 0,5 ml Wasser sowie 3 ml Hexan. Nach Zentrifugation (25.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde die Hexanphase entnommen, die Restphase 2 mal mit je 3 ml Hexan reextrahiert und der vereinigte Hexanextrakt schonend eingengt. Zur Analyse mittels HPLC wurden die Proben in 100 μ l Laufmittel [100 Volumeneinheiten (VE) Hexan, 3 VE tert-Butylmethyläther, 0,045 VE Iso-Butylalkohol) aufgenommen. Standardsubstanzen wurden entsprechend behandelt und dienten der Identifikation die Lipide anhand ihrer Retentionszeiten in der HPLC-Analyse.

2.14 HPLC-Analyse

Die Lipidanalyse erfolgte an einer HPLC-Anlage der Fa. Abimed/Gilson (Langenfeld) mit Datenverarbeitung mittels der Programme "Gilson HPLC System Controller 715" - Version 1.01, "GME Key" - Version 1.31 und "GSIOC" - Version 1.5. auf einem Abimed-Computer ("Wisdom 386 Mega Speed").

Das Meßsystem setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Pumpen:	Modell 306
Manometermodul:	Modell 805
Dynamikmischer:	Modell 811B

Detektor: Modell 116 (UV-Detektion bei 230 nm)
Vorsäule: LiChroCART 4-4, gepackt mit Kieselgel LiChroSpher Si 60
Trennsäule: "Hibar[®]" Edelstahl-Fertigsäule RT, 250-4, gepackt mit Kieselgel
LiChroSpher[®] Si 100; (mittlere Korn- bzw. Porengrößen: jeweils 5
µm bzw. 100 Å; beide Säulen und Packungsmaterial von Merck)

Die Auftrennung der Lipide erfolgte bei einem isokratischen Laufmittelfluß von 1 ml/min bei RT.

2.15 Biochemisch-fluorometrischer Nachweis von H_2O_2

Der Nachweis von H_2O_2 als ein Produkt des "respiratory burst" (vgl. Kap. 1.1.3) kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Der hier eingesetzte sensitive und spezifische fluorometrische Assay beruht auf der von Peroxidase und H_2O_2 vermittelten extrazellulären Umwandlung des nichtfluoreszierenden Agens p-Hydroxyphenyl-Essigsäure (PHPA) zu einem fluoreszierenden Dimer $[(PHPA)_2]$; Hinshaw & Burger 1990; Nahum et al. 1990].

Die Färbelösung besteht aus 1 mM PHPA und 20 Einheiten (Meerrettich)-Peroxidase in modifiziertem Gey's Puffer (HEPES-gepufferter Phosphatpuffer mit 1,3 mM Mg^{2+} , 1,5 mM Ca^{2+} , pH 7,3). Die Zellen wurden in der Färbelösung mit 100 ng/ml PMA stimuliert und bis zu 120 min bei 37 °C in Dunkeln inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Aliquots entnommen, die Zellen pelletiert (5 min, RT, 800 x g) und der Überstand im Fluorometer (Modell: SFM 25, Fa. Kontron Instruments, Eching; Anregungswellenlänge: 323 nm, Emission: 400 nm) gemessen. Die so erhaltenen relativen Fluoreszenzwerte wurden anhand einer Eichkurve in H_2O_2 -Konzentrationen umgerechnet.

2.16 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens dreimal, z.T. mehr als zehnmal wiederholt. Die Unterschreitung der Mindestzahl ist jeweils durch Angabe der exakten Anzahl ("n = ...") ausdrücklich vermerkt. Soweit Fehlerbalken angegeben sind, handelt es sich um den Standardfehler der Mittelwertes, der ebenso mit Hilfe der RS/1-Software (BBN Software Products Corporation, Cambridge, MA, USA) berechnet wurde wie die Signifikanzen. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angesehen. Diese Meßwerte sind in den Abbildungen mit * gekennzeichnet. Signifikante Strahleneffekte sind mit # gekennzeichnet. Bei offensichtlich signifikanten Effekten, wie z.B. der Hemmung des "respiratory burst" um 90%, wurde auf eine separate Kennzeichnung verzichtet.

3. Ergebnisse

3.1 Strahlenbiologische, immunphänotypische und funktionelle Charakterisierung des HL-60 Modells

In diesem Kapitel des Ergebnisteils soll die grundsätzliche Eignung des HL-60-Modells für die Untersuchungen zur intrazellulären Signalübertragung nach Bestrahlung gemäß der 3. Fragestellung der Einleitung (vgl. Kap. 1.4) aufgezeigt werden. Die dazu vorgenommenen Untersuchungen charakterisieren die HL-60 Zelle als strahlenempfindlich, mit einer Sensitivität, die hämatopoetischen Progenitorzellen entspricht. Dies deckt sich der Einstufung als späte Progenitorzelle der Myelopoese, die "nur einen Schritt von ihrem Reifsein entfernt ist" (ein anonymes Journal-Gutachter). Die weitere Charakterisierung der HL-60 Zellen beinhaltet die im Laufe der Differenzierung stattfindenden immunphänotypischen und funktionellen Veränderungen (z.B. "respiratory burst") sowie die Ausprägung molekularer und biochemischer Merkmale (PKC-Isoenzym-Muster und PKC-Aktivität; β -Actin-mRNA-Expression, F-Actin-Gehalt und Lipid-2nd messenger).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an HL-60 Zellen werden dabei - soweit möglich - jeweils mit denen an reifen neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes verglichen.

3.1.1 Zellproliferation, Differenzierung und Überleben nach Bestrahlung

Die HL-60-Zellen wachsen unter den angewandten Kulturbedingungen (ohne Induktion zur Differenzierung) mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von ca. 23 h (Sendler et al. 1993) bis zu einer Zelldichte von ca. $3 \times 10^6/\text{ml}$, die am 5. Tag nach Anlegen der Kultur erreicht wird (Abb. 9). Metabolit-Messungen im Medium zeigen, daß zu diesem Zeitpunkt Glucose und Glutamin praktisch aufgebraucht sind (Ergebnisse nicht gezeigt; Herzog et al.; Publikation in Vorbereitung).

Die Induktion zur Differenzierung der Zellen mit 1,25% DMSO verlängert nach dem 1. Tag nach Kulturbeginn die effektive Verdopplungszeit auf ca. 60 h, so daß bereits am 3. Tag ein Plateau bei einer Zelldichte von ca. $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht wird (Abb. 9). Bestrahlung mit 1 Gy gefolgt von DMSO-Gabe erhöht die effektive Verdopplungszeit auf ca. 74 h; am Ende der Beobachtungszeit wird eine Zelldichte von ca. $0,4 \times 10^6/\text{ml}$ erreicht (Abb. 9).

Die "plating efficiency" DMSO-induzierter Zellen in Softagar nimmt von ca. 80% (nicht-induzierte Zellen) auf ca. 10% am 6. Tag nach Anlegen der Kultur als Ausdruck von Differenzierungsvorgängen und damit abnehmender Proliferation ab (Abb. 10).

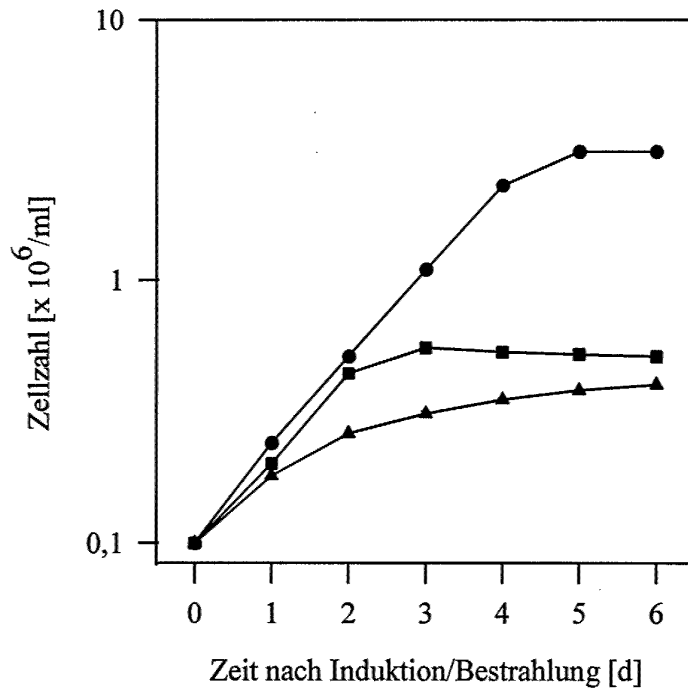


Abb. 9:

Wachstum von HL-60 Zellen in Kultur. 1×10^5 Zellen/ml wurden in RPMI 1640-Medium am Tag 0 ausgesät (●), mit 1,25% DMSO behandelt (■) oder mit 1 Gy bestrahlt und mit DMSO behandelt (▲).

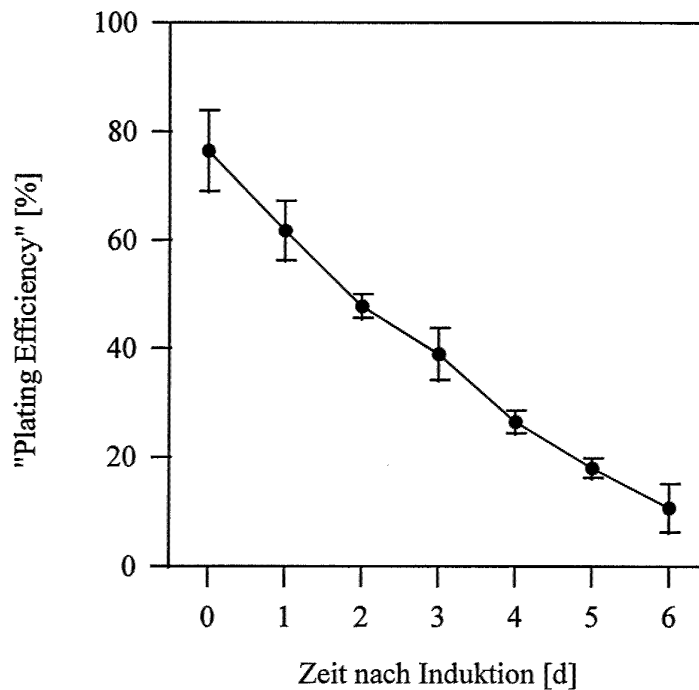


Abb. 10:

"Plating efficiency" DMSO-behandelter HL-60 Zellen in Softagar. Die Zellen wurden am Tag 0 mit DMSO zur Differenzierung induziert, zu den angegebenen Zeitpunkt in Softagar ausgebracht und die "plating efficiency" nach 7 d durch Auszählen der fixierten und gefärbten Kolonien bestimmt.

Die Klonogenität uninduzierter Zellen nach Bestrahlung ist in Abb. 11 dargestellt. Die Dosiseffektkurve zeigt in der üblichen halblogarithmischen Darstellungsweise einen linearen Verlauf, ohne eine sog. "Schulter". Die strahlenbiologischen Kenngrößen D_0 und D_q wurden mit 0,63 Gy und 0 Gy bestimmt.

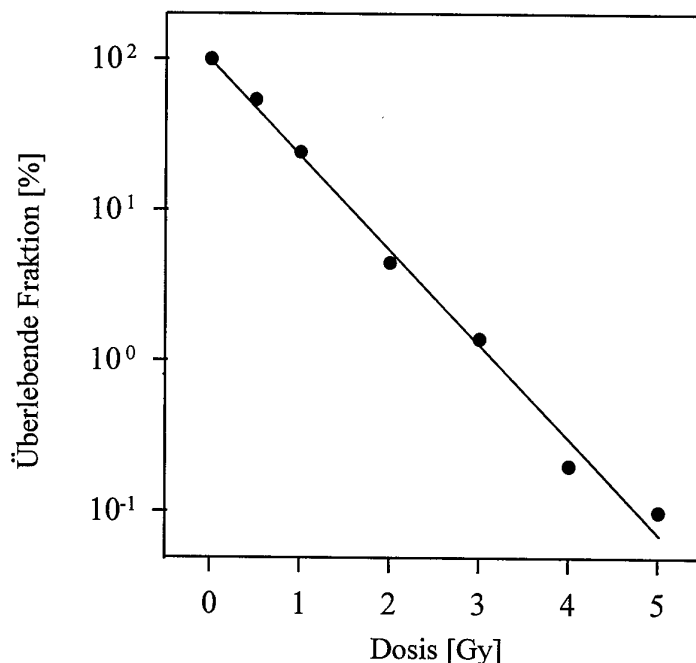


Abb. 11: Überleben uninduzierter HL-60 Zellen nach Bestrahlung ("Klonierungstest"). Die Zellen wurden unmittelbar nach dem Platieren in Softagar bestrahlt und die Klone nach 7 Tagen fixiert, gefärbt und ausgezählt.

3.1.2 Phänotypische Veränderungen unter Differenzierung und/oder Bestrahlung

Die veränderte Ausprägung phänotypischer Merkmale ist neben anderen Kriterien (Verlust der Immortalität, Einstellung der Proliferation; s. Kap. 3.1.1) ein weiteres Kennzeichen eines ablaufenden Differenzierungsprozesses. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Oberflächenepitope bestimmt, die der funktionellen Charakterisierung sowie der Reifegradbestimmung und der Linienzuordnung hämatopoetischer Zellen dienen. Sie werden anhand ihrer CD ("Cluster of Differentiation")-Nummern benannt.

Einige klassische Epitope von T-Lymphozyten (CD3, CD8, CD25) und B-Lymphozyten (CD19) wurden erwartungsgemäß unter allen untersuchten Bedingungen von HL-60 Zellen nicht exprimiert (Ergebnisse nicht gezeigt). Konstitutiv waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt und auf allen Zellen vorhanden die Antigene CD11a (α -Kette aus der Familie der β_2 -Integrine; bildet zusammen mit CD18 Heterodimere: CD11x/CD18; leukozytäres Adhäsionsmolekül), CD15 (Marker für myeloische Zellen, Kohlehydrat-Ligand für

endotheliales Selectin; Varki 1994), CD18 (s.o.), CD32 und CD64 (s.u.) sowie CD45, ein Rezeptor mit Protein-Phosphatase-Aktivität (Cui et al. 1994), der allen reifen Leukozyten gemein ist (Ergebnisse nicht gezeigt; Roitt et al. 1995). Die Epitope CD16, CD32 und CD64 bilden die Gruppe der Rezeptoren für den konstanten Teil (Fc) von Immunglobulinen (Ig) der G-Klasse (γ) - Fc γ RIII, -II und -I (Hogg 1988; Ravetch 1994). Sie waren auf unterschiedlichen Niveaus stabil exprimiert (s.o. und Tab. 1), d.h. die Induktion der Differenzierung oder die Bestrahlung beeinflussten die Expression dieser Rezeptoren nicht. Diese Aussage gilt auch für den "klassischen" Marker für Helfer-T-Lymphozyten, CD4, der auch schwach auf Mono- und Granulozyten exprimiert wird (eigene Beobachtung). Er war auf einer HL-60 Subpopulation mit einem Anteil von ca. 35% der Zellen unverändert durch die Induktion der Differenzierung oder die Bestrahlung vorhanden (Tab. 1).

Abb. 12 faßt die Ergebnisse zu denjenigen Epitopen zusammen, die im Laufe der Differenzierung und nach Differenzierung plus Bestrahlung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen Veränderungen erfahren. Dies betrifft die CD-Antigene CD11b, CD11c, und CD14 sowie den Formylpeptid-Rezeptor (FPR). CD14 stellt den Rezeptor für den Komplex des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS) mit seinem physiologischen Bindungsprotein dar (Roitt et al. 1995).

Uninduzierte HL-60 Zellen zeigen keine signifikante Expression der vier hier zuletzt aufgeführten Epitope. Induktion zur Differenzierung der Zellen verursacht deren Ausprägung auf der Zelloberfläche. Im Einzelnen werden ohne Bestrahlung folgende Anteile Rezeptor-positiver Zellen an der Gesamtpopulation 6 Tage nach Inkubation mit DMSO gefunden: CD11b: 90%; CD11c: 70%; CD14: 40%, CD16: 30%; CD64: 95%; FPR: 80%. Die Anstiege zu den genannten Anteilen verlaufen dabei z.T. unstetig und gehen über (Zwischen)-Maxima zu früheren Zeitpunkten, wie z.B. CD11c- und CD14-Expression am 3. Tag (Abb. 12).

Diese zwischenzeitlichen Maxima werden verstärkt durch die Bestrahlung der Kulturen am Tag 0 mit 1 Gy (Abb. 12). Sie verursacht am Tag 3 bei der CD11b-Expression eine Zunahme um 20% (ca. 50% $\rightarrow$ ca. 70%), bei der CD11c-Expression um ca. 25% (ca. 35% $\rightarrow$ ca. 60%), bei der CD14-Expression um ca. 20% (ca. 35% $\rightarrow$ ca. 55%) sowie beim FPR am 2. Tag um ca. 14% (18% $\rightarrow$ 32%; Kaffenberger & van Beuningen 1994). Alle aufgeführten Veränderungen einer verstärkten Epitopausprägung am 2. - 4. Tag nach Bestrahlung sind statistisch signifikant. Für die Expression der CD11b-, CD11c- und CD14-Antigene konnte eine positive Korrelation zwischen der Strahlendosis (0 bis 2 Gy in 0,5 Gy-Schritten) und dem Mittelwert des 1. Maximums der Rezeptorpositivität ermittelt werden (Ergebnisse nicht gezeigt; Dyballa 1995). Zu späteren Zeitpunkten (je nach Antigen 4.-6. Tag) werden keine Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Kulturen mehr gefunden (Abb. 12).

Die durchschnittliche relative Rezeptordichte Antigen-positiver Zellen kann in der Durchflußzytometrie über die mittlere Fluoreszenzintensität der markierten Population bestimmt werden. Ein Strahleneffekt konnte hierbei nicht nachgewiesen werden, jedoch (für CD11b, CD11c und CD14) eine zeitliche Abhängigkeit der zunehmenden Rezeptordichten von der Länge der Induktionsdauer, d.h. der Reifung der HL-60 Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

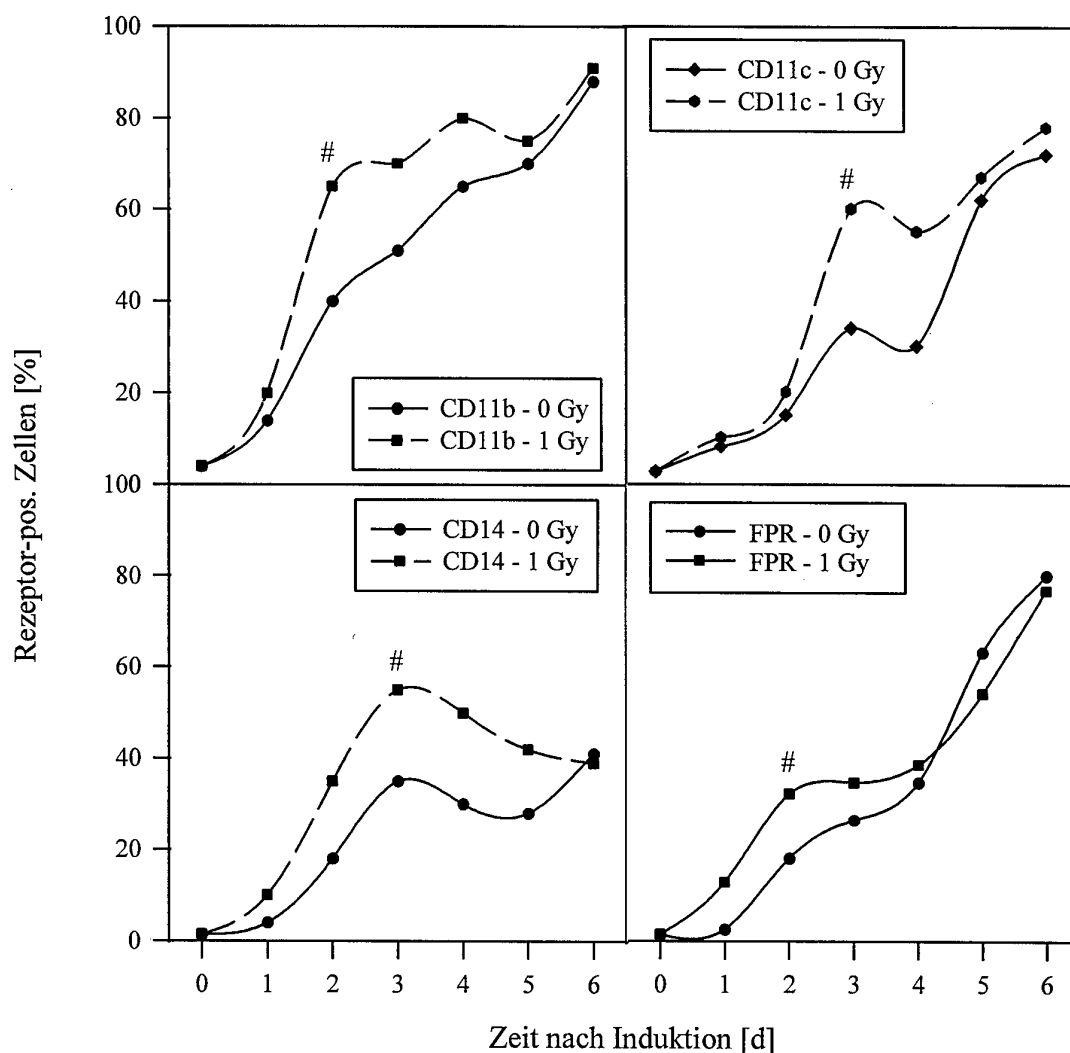


Abb. 12: Phänotypische Veränderungen von HL-60 Zellen nach Induktion zur Differenzierung und Differenzierung plus Bestrahlung. HL-60 Kulturen wurden angelegt, mit DMSO behandelt (●) oder mit 1 Gy bestrahlt und mit DMSO behandelt (■). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellaliquots entnommen, mit den entsprechenden Antikörpern bzw. Hexapeptid (FPR) markiert und der Anteil Antigen-positiver Zellen an der Gesamtpopulation durchflußzytometrisch bestimmt. Zur Meßproblematik bzw. zur Meßempfindlichkeit der Durchflußzytometrie siehe Kap. 4.1.2 bzw. 4.1.3. (#: signifikanter Strahleneffekt).

Tabelle 1 listet beispielhaft die phänotypischen Eigenschaften von HL-60-Granulozyten (6 d nach DMSO-Induktion) im Vergleich zu uninduzierten HL-60 Zellen (0 d) und zu reifen Granulozyten des peripheren Blutes für eine repräsentative Phänotypisierung auf.

Tab. 1: Vergleich des Phänotyps von HL-60 Zellen (0 d vs. 6 d nach Induktion der Differenzierung mit 1,25% DMSO) mit reifen Granulozyten des peripheren Blutes [Angaben in % der Gesamtpopulation].

Antigen [#]	HL-60 Zellen		Granulozyten
	0 d	6 d	
CD4	35§	35§	5§
CD11b	5	90	> 98
CD11c	3	70	> 90
CD14	2	40	> 35
CD16	30	30	> 98
CD64	> 95	> 95	> 85
Formylpeptid-Rezeptor	2	80	> 98

[#] soweit nicht auf allen drei Zelltypen konstitutiv exprimiert (siehe Text)

[§] alle Angaben unter Berücksichtigung des Anteils falsch-positiver Zellen der Negativ-Kontrollen.

3.1.3 Funktionelle Reifung unter Differenzierung und/oder Bestrahlung

Neben den phänotypischen Veränderungen (vgl. Abb. 12 und Tab. 1) kann als weiteres Kriterium für die Differenzierung der HL-60 Zellen zu reiferen granulozytären Zellen in Anwesenheit von DMSO die funktionelle Reifung anhand der Entwicklung von Immunkompetenz angesehen werden, die bei diesen Zellen anhand der Fähigkeit zur Phagozytose und/oder zur Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion getestet werden kann.

Uninduzierte HL-60 Zellen sind nicht in der Lage zu phagozytieren (Dybala 1995), während DMSO-behandelte Zellen eine kontinuierliche Zunahme der Phagozytoseaktivität auf ca. 60% aktiver Zellen am 4. bis 6. Tag nach Induktion zeigen. Die Kinetik der Phagozytose von HL-60 Zellen am Tag 5 über 60 min ist in Abb. 13 im Vergleich zu der reifer Granulozyten aus Vollblut gezeigt. Die Entwicklung der Phagozytose wird durch eine Bestrahlung der HL-60 Zellen mit 1 Gy am Tag 0 nicht signifikant beeinflusst.

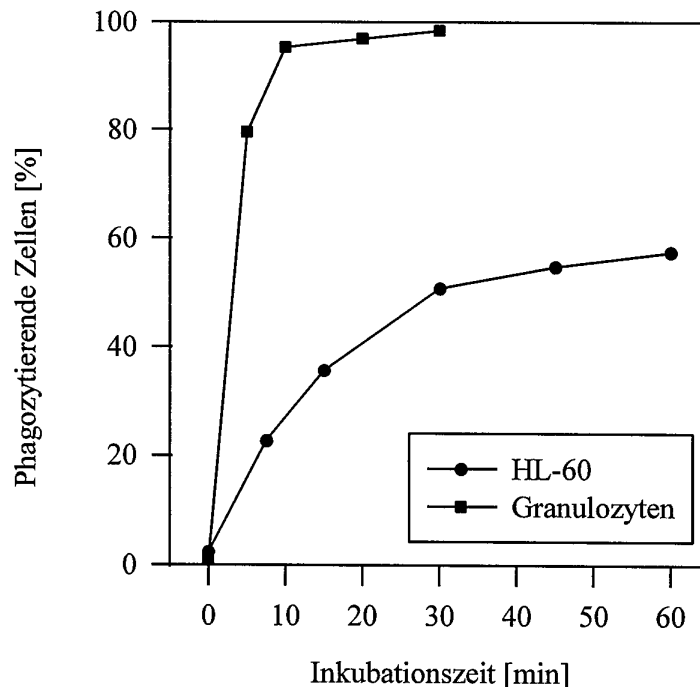


Abb. 13: Phagozytose-Aktivität von HL-60 Zellen nach 5 d der Differenzierung unter DMSO. Die Zellen wurden mit FITC-konjugierten, opsonierten *E. coli*-Bakterien inkubiert und der Anteil Phagozytose-positiver Zellen durchflußzytometrisch bestimmt (●). Kinetik der Phagozytose reifer Granulozyten aus Vollblutansatz zum Vergleich (■).

Die "respiratory burst"-Aktivität von Phagozyten kann auf unterschiedliche Art und Weise bestimmt werden. 1. Die Reduktion des Nitroblau-Tetrazolium (NBT)-Salzes zu einer wasserunlöslichen Formazanverbindung testet nach geeigneter Stimulation der Zellen das intrazelluläre Vorkommen von Superoxidanionen (Breitman et al. 1980), während 2. die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mittels der Farbstoffe DCFH und DHR 123 dargestellt werden kann, die durch Oxidation zu Fluorochromen werden (Bass et al. 1983; Rothe et al. 1988; vgl. dazu auch Kap. 4.2.1). 3. Die Chemie der Luminol-abhängigen Chemolumineszenz ist nicht eindeutig bestimmt und umfaßt mehrere Sauerstoffspezies und Enzyme (Myeloperoxidase; Brestel 1985; Edwards 1987; de Groot, pers. Mitteilung 1995; Château et al. 1996; vgl. Kap. 4.2.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten in vitro-Stimuli der "respiratory burst"-Reaktion (PMA: 100 ng/ml; f-MLP: 1 μ M mit 10 μ M CytB sowie Immunkomplexe: 120 μ g/ml) sind in diesen Konzentrationen nicht toxisch, d.h. sie stimulieren zwar maximal den "respiratory burst", aber sie sind nicht zelltötend, wie entsprechende Untersuchungen ergaben (Ergebnisse nicht gezeigt).

Uninduzierte HL-60 Zellen sind nicht in Lage das NBT-Salz zu reduzieren. Diese Fähigkeit beginnt sprunghaft zwischen dem 1. und 2. Tag nach Induktion zur Differenzierung mit einem Anteil von ca. 70% NBT-positiver Zellen nach Stimulation mit PMA. Im weiteren Verlauf der Kultivierung der Zellen in DMSO steigt der Anteil auf ca. 90% am 6. Tag (Abb. 14).

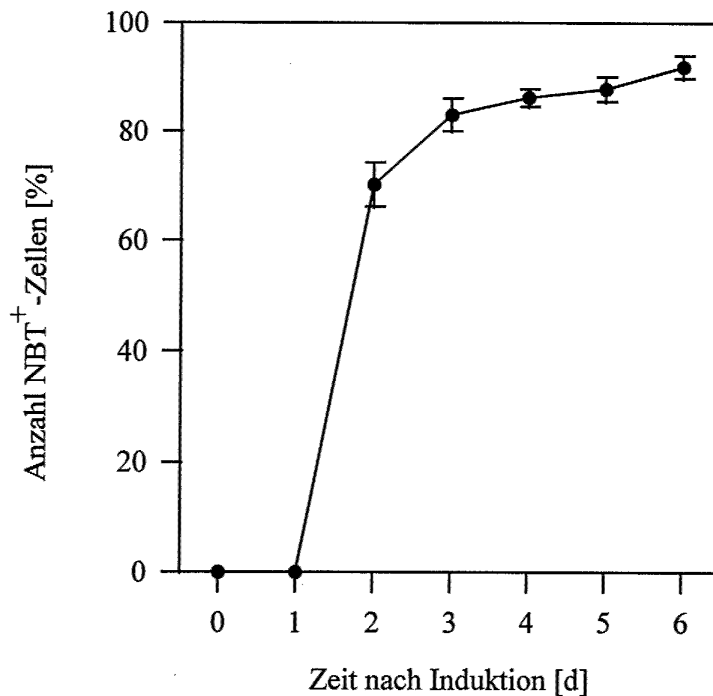


Abb. 14: Entwicklung der "respiratory burst"-Reaktion während der Differenzierung von HL-60 Zellen: 1. NBT-Test. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung mit DMSO wurden Zellaliquots entnommen, in Anwesenheit des Nitroblautetrazolium-Salzes (NBT) 20 min mit PMA stimuliert und der Anteil NBT-positiver Zellen durch lichtmikroskopisches Auszählen von wenigsten 200 Zellen bestimmt.

Die Oxidation von DHR 123 zu "grün"-fluoreszierendem Rhodamin 123 kann in der durchflußzytometrischen Analyse als eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nach Stimulation der Zellen gemessen werden. Abb. 15 zeigt in sog. "Histogrammen" beispielhaft eine derartige Fluoreszenzzunahme nach Stimulation von HL-60 Zellen (am Tag 5 nach DMSO-Induktion) mit PMA. Dabei ergibt sich eine relativ homogene Reaktion der mit PBS scheinstimulierten Zellen (Histogramm C) wie der Phorbol ester-stimulierten (Histogramm B), d.h. die Fluoreszenzanstiege betreffen alle Zelle mehr oder weniger gleichmäßig. Das Ausmaß der über alle Zellen gemittelten Fluoreszenzzunahme ist dabei ein relatives Maß für die Intensität der "respiratory burst"-Reaktion. Der in diesem Beispiel bestimmte Faktor der Fluoreszenzzunahme ("Stimulationsfaktor"; vgl. Kap. 2.9 und Abb. 16) betrug ca. 35.

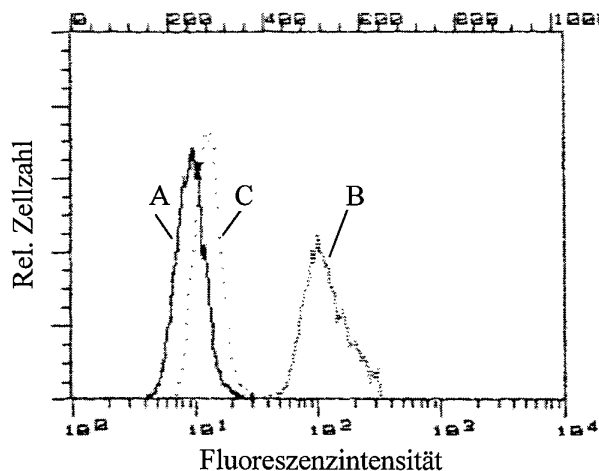


Abb. 15: "Respiratory burst"-Reaktion: 2. Durchflußzytometrischer Nachweis mit Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) als Indikatorsubstanz. HL-60 Zellen (5 Tage nach DMSO-Induktion) wurden 15 min mit DHR 123 beladen, nach Messen der Ausgangsfluoreszenz ("Histogramm" A) wurde der Ansatz halbiert und mit PMA (B) für 60 min stimuliert bzw. mit PBS schein-stimuliert (C).

Ohne Induktion zur Differenzierung sind HL-60 Zellen nicht in der Lage DHR 123 zu oxidieren. Dies gilt sowohl für die Stimulation der Zellen mit PMA als auch mit f-MLP (plus CytB). Die Stimulierbarkeit mit f-MLP setzt am 2. - 3. Tag nach DMSO-Behandlung ein und erreicht in ihrem Ausmaß ein Plateau am 5. Tag, während die zelluläre Antwort auf den PMA-Stimulus kontinuierlich bis zum 6. Tag ansteigt (Abb. 16). Die Menge produzierter Sauerstoffspezies - gemessen als Fluoreszenzanstieg über den Ausgangswert - durch HL-60 Zellen 4-6 Tage nach Induktion ihrer Differenzierung mit DMSO beträgt nach PMA-Stimulation ca. 50% der reifer neutrophiler Granulozyten (Kaffenberger & van Beuningen 1994) und wird durch entsprechende luminometrische Daten belegt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Das Luminol-verstärkte Chemolumineszenz-Verfahren der "respiratory burst"-Messung erlaubt neben der quantitativen Bestimmung der Sauerstoffradikale eine Aussage zur Kinetik ihrer Entstehung nach Stimulation der Zellen, z.B. mit PMA. Abb. 17 zeigt die Zunahme der Lichtausbeute auf ca. 215% am Tag 7 (bestimmt als das Integral über die gesamte Meßzeit) zwischen den Tagen 3 und 7 nach DMSO-Induktion der HL-60 Zellen. Gleichzeitig verlagert sich der Zeitpunkt der maximalen Lichtausbeute ("Peakzeit") als Maß der Reaktionsgeschwindigkeit der Zellen von nahezu 50 min (Tag 3) auf ca. 13 min am 7. Tag (Abb. 17). Nach Stimulation der Zellen am 4 - 6. Tag mit f-MLP beträgt diese mit 1-gipfliger Verteilung ca. 30 sec im Vergleich zu ca. 3-5 min bei Granulozyten mit 2-gipfliger Verteilung (Ergebnisse nicht gezeigt; s. Kap. 4.2.3.1.4).

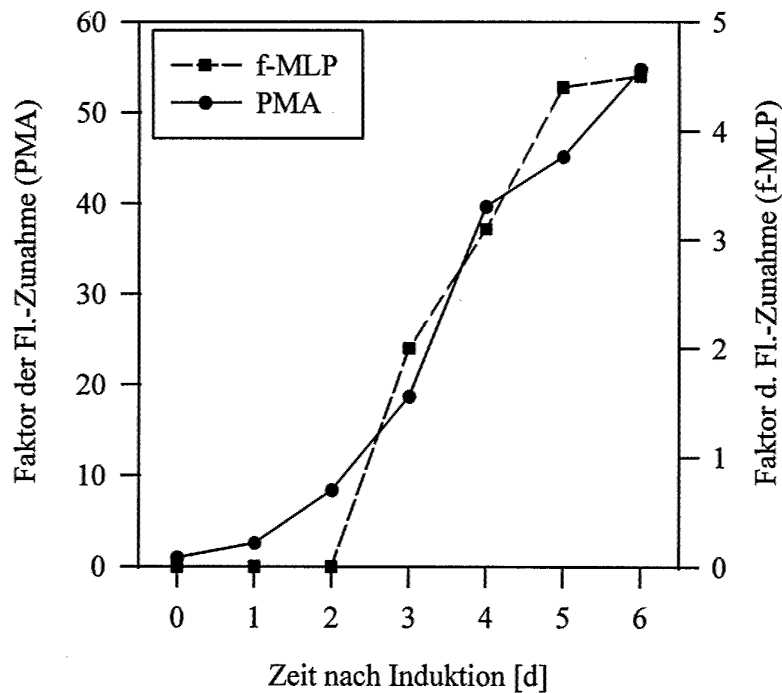


Abb. 16: Entwicklung des "respiratory burst" während der Differenzierung von HL-60 Zellen. Assay wie bei Abb. 15 [Stimulation mit PMA (●) bzw. f-MLP (■)], Ergebnis dargestellt als Faktor des Fluoreszenzanstiegs (s. Kap. 2.9).

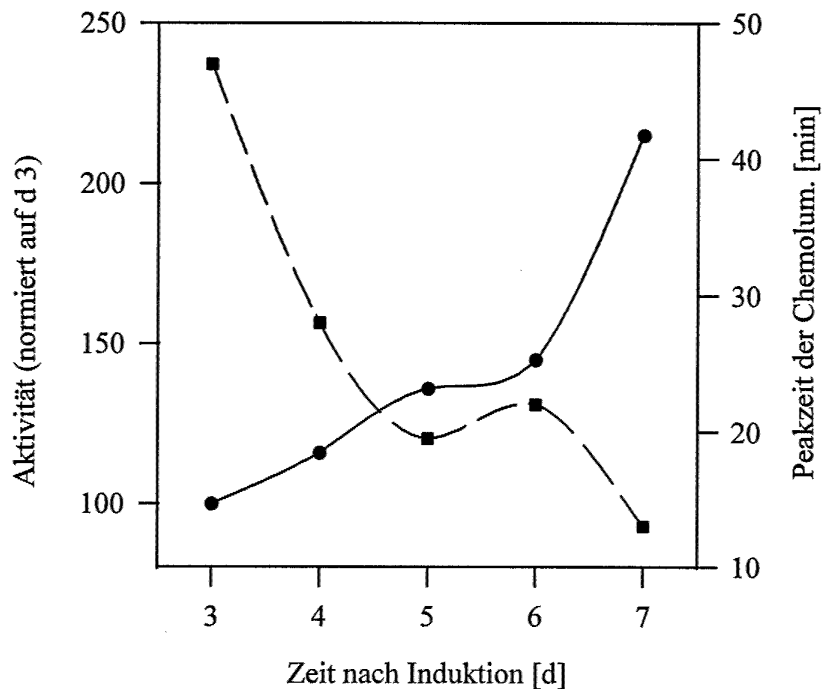


Abb. 17: "Respiratory burst"-Reaktion: 3. Chemoluminometrischer Nachweis. HL-60 Zellen nach DMSO-Induktion wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit Luminol und (Meerrettich)-Peroxidase äquilibriert und mit PMA stimuliert (60 min). Das Integral der Lichtausbeute ("Aktivität"; ●) über die gesamte Stimulationszeit ist neben der Veränderung des Peakzeit (■) der maximalen Chemolumineszenz dargestellt.

3.1.3.1 Ausstattung von Granulozyten und HL-60 Zellen mit antioxidativen Mechanismen

Da das im Zuge der "respiratory burst"-Reaktion gebildete H_2O_2 als eine wesentliche Komponente des oxidativen Angriffs auf Zellbestandteile praktisch ungehindert Zellmembranen passieren kann (Test & Weiss 1984; Edwards 1994), ist zum Selbstschutz von Zellen mit "respiratory burst"-Aktivität eine entsprechende Ausprägung von antioxidativen Mechanismen zu erwarten. In reifen Granulozyten besteht ein wichtiges Element des antioxidativen Schutzes in Form von Katalase-Aktivität zum Abbau von H_2O_2 zu Wasser (Edwards 1994).

In HL-60 Zellen (Tag 5 nach DMSO-Induktion) ist dieser Selbstschutz vor H_2O_2 noch immer geringer ausgeprägt als in Granulozyten. Ein biochemisch-fluorometrischer Nachweis von H_2O_2 mit Hilfe von para-Hydroxyphenyl-Essigsäure im Reaktionsansatz zeigt zwei Stunden nach PMA-Stimulation der Zellen eine ca. 8-fach höhere Oxidanzienkonzentration in HL-60 Zellen als in Granulozyten (Abb. 18). Die Anstiege der H_2O_2 -Konzentrationen in den Ansätzen erfolgen kontinuierlich über 120 min, wobei die Kinetik der Produktion durch Granulozyten sehr viel flacher verläuft (Abb. 18). In Anwesenheit von 5 mM Na-Azid im Ansatz zur Inhibition von Katalase-Aktivität (Bass et al. 1983) ver-

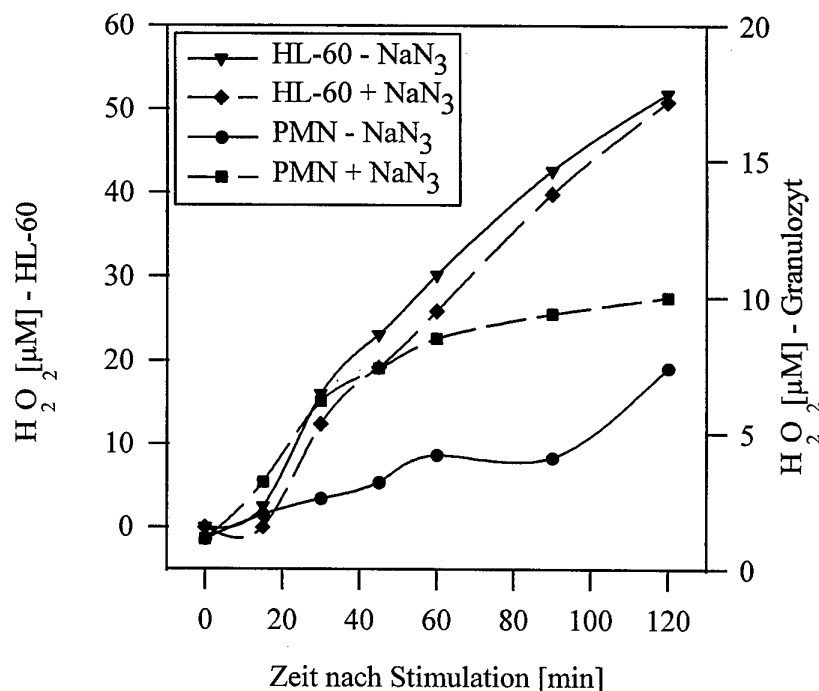


Abb. 18: Biochemisch-fluorometrischer Nachweis von H_2O_2 aus Granulozyten (PMN) und HL-60 Zellen (5 d DMSO) und Effekt von Na-Azid. Die Zellen wurden in Anwesenheit von para-Hydroxyphenyl-Essigsäure mit (○, ■) und

ohne (t, •) Na-Azid mit PMA stimuliert und H_2O_2 zu den angegebenen Zeitpunkten fluorometrisch gemessen.

doppelt sich in etwa die Menge an gemessenem H_2O_2 der Granulozyten, während Na-Azid in HL-60 Zellen keinen nennenswerten Effekt ausübt (Abb. 18). Dieses Ergebnis zeigt im nicht-inhibierten Ansatz eine Kompetition zwischen dem H_2O_2 -Nachweisreagenz und Katalase-Aktivität um das Substrat und somit eine quantitative Unterschätzung des gebildeten Wasserstoffperoxids um ca. 50% in Granulozyten.

Die (Katalase)-Aktivität aus Zellaufschlüssen von 1×10^6 Granulozyten baut eine $500 \mu\text{M}$ H_2O_2 -Lösung innerhalb von 15 min bei 37°C vollständig ab, ist durch 5 mM Na-Azid komplett hemmbar und hitzelabil (95°C , 10 min) (Tab. 2).

Tab. 2: Abbau von H_2O_2 ($500 \mu\text{M}$) durch Enzymaktivität(en) aus 1×10^6 Zellen.

	Zellaufschluß	+ 5 mM Na-Azid	10', 95°C	Puffer
H_2O_2	0,0§	100	97,2	98,9

§ in [%] der eingesetzten Menge

Die UV-spektrometrische Bestimmung von Katalase-Aktivität bestätigt eine etwa doppelt so hohe Aktivität in Granulozyten im Vergleich zu HL-60 Zellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit können HL-60 Zellen hinsichtlich ihres antioxidativen Schutzes durch Katalase im Vergleich mit reifen Granulozyten als weniger geschützt betrachtet werden. Zumindest in undifferenzierten HL-60 Zellen soll Katalase-Aktivität stärker kompartimentiert vorliegen als in Granulozyten (Ballinger et al. 1994) und steht möglicherweise deswegen weniger effektiv zum antioxidativen Schutz bereit.

3.1.4 Veränderungen von PKC-Isoenzym-Mustern nach Differenzierung und/oder Bestrahlung

Da die Ausstattung von HL-60 Zellen mit Isoenzymen der Proteinkinase C in verschiedenen Differenzierungsstufen variieren soll (Tanaka et al. 1992) und PKC-Aktivität eine entscheidende Rolle bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion zugesprochen wird (s. Kap. 1.1.4 und 3.2.2), wurden entsprechende Untersuchungen mittels "Western blot"-Analyse vorgenommen. Dazu erfolgte zunächst eine Anreicherung von PKC-Proteinen über Affinitätschromatografie mit einem pan-PKC-Antikörper (Klon MC-5) gegen die "konventionellen" Isoformen (α , β , γ) sowie PKC ζ . Die Ergebnisse wurden mit denen gewonnen an reifen Granulozyten verglichen, wobei quantitative Vergleiche zwischen

verschiedenen Isoenzymen nicht erlaubt sind, da die zur Detektion verwendeten, z.T. polyklonalen Antikörper hinsichtlich Qualität, Herkunft, Affinität, etc. nicht untereinander vergleichbar sind (Fa. Santa Cruz; persönliche Mitteilung).

Abb. 19 zeigt das gleichzeitige Vorliegen der "klassischen" Isoenzyme PKC α , - β_I und - β_{II} im undifferenzierten Zustand der HL-60 Zellen, nach 4 Tagen der Differenzierung der Zellen und in Granulozyten. Die Induktion der Differenzierung der HL-60 Zellen mit DMSO führte nicht zu eindeutigen Veränderungen auf dem Niveau dieser PKC-Isoenzyme (Abb. 19).

Die Fraktionierung induzierter HL-60 Zellen in eine Zytosol- und eine Membranfraktion (s. Kap. 2.12) verdeutlicht, daß diese PKC-Isoenzyme im unstimulierten Zustand relativ gleichmäßig zwischen den beiden Fraktionen verteilt sind (Abb. 20). Diese Verteilung konnte durch Stimulation der Zellen mit PMA (10 min) entscheidend zu Gunsten der Membranfraktion verschoben werden ("Translokation", Abb. 20). Der Nachweis von PKC ζ (Stasia et al. 1990) war in keinem der drei Zelltypen möglich.

Bestrahlung der HL-60 Zellen mit 1 Gy und anschließender Induktion zur Differenzierung hat keinen nennenswerten Effekt auf dem Proteinniveau der PKC-Isoenzyme (Ergebnisse nicht gezeigt).

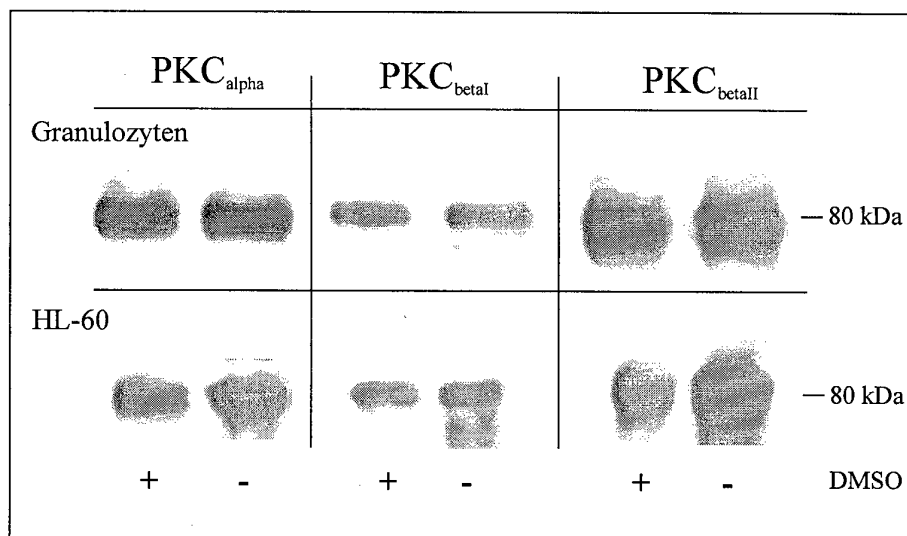


Abb. 19: Expression von Proteinkinase C-Isoenzymen in undifferenzierten HL-60 Zellen und nach Differenzierung (4 d DMSO) sowie in Granulozyten. Die Zellen wurden lysiert, PKC-Isoformen über Affinitätschromatografie mit einem "pan-PKC"-Antikörper angereichert und mittels "Western blot" die Isoenzyme PKC α , - β_I und - β_{II} dargestellt.

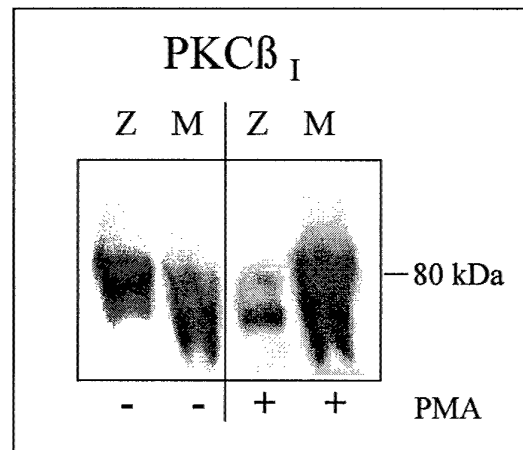


Abb. 20: "Translokation" von PKC-Isoenzymen. HL-60 Zellen, 4 d nach Induktion der Differenzierung, wurden mit PMA (+) stimuliert (10 min) oder blieben unstimuliert (-), lysiert und in Zytosol (Z) und Membranfraktion (M) fraktioniert. Nach Anreicherung von PKC-Isoenzymen (siehe Text und Legende zu Abb. 19) Nachweis der PKCβ_I im "Western blot".

3.1.5 Veränderung der PKC-Aktivität unter Differenzierung und/oder Bestrahlung

Die Bestimmung von PKC-Aktivität und deren mögliche Veränderung unter Differenzierung und/oder Bestrahlung erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits, der jedoch systembedingt nur die maximale Aktivierung Ca²⁺-abhängiger sowie Ca²⁺-unabhängiger Isoenzyme gewähren soll (Fa. Amersham; persönliche Mitteilung). Die Aktivität der "atypischen" PKC-Klasse (s. Kap. 4.2.3.1.4 - PKCζ ist in Neutrophilen nachgewiesen; Stasia et al. 1990; Dang et al. 1994) kann somit nicht erfaßt werden. Über deren Bedeutung bei der Aktivierung von Neutrophilen/HL-60 Zellen liegen bisher keine gesicherten Erkenntnisse vor (Thelen et al. 1993). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten jedoch eine zunehmende Bedeutung von "atypischen" PKC-Isoformen als Effektoren von PI3-Kinase-Aktivität (vgl. Kap. 3.2.6, 4.1.4 und 4.5.1) an.

Die nachfolgenden relativen Angaben der Gesamtaktivität in HL-60 Zellen beziehen sich auf Zellen, die nicht induziert (DMSO) und nicht stimuliert (PMA) waren (üblicherweise 24 h nach Umsetzen der Kultur). Deren PKC-Aktivität wird gleich 100% gesetzt. Die Induktion der Differenzierung der HL-60 Zellen verursacht eine deutliche Reduktion der detektierbaren Gesamt-PKC-Aktivität um ca. 30% nach 4 - 6 Tagen (p: < 0,05 vs. Zellen ohne DMSO; Abb. 21a). Die Bestrahlung der Zellen (1 Gy am Tag 0) verstärkt diese persistierende Abnahme um weitere 10% (p: < 0,05 vs. 0 Gy; Abb. 21a).

Eine Vorbehandlung aller drei Zelltypen (HL-60 Zellen ± DMSO, Granulozyten) für 10 min mit PMA ("PMA-priming") führt zu zelltypabhängig erhöhten Phosphorylierungen

und zeigt damit das Vorhandensein eines PKC-Aktivitätspotentials, welches durch die Aktivatoren des PKC-Bestimmungskits (s. Kap. 2.12) normalerweise nicht erfaßt wird (Abb. 21a; 2., 6. und 10. Säule von links). Im quantitativen Vergleich zwischen den drei verschiedenen Zelltypen finden sich hinsichtlich des "priming"-Effektes auf die meßbare Gesamt-PKC-Aktivität folgende Ergebnisse: Uninduzierte Zellen zeigen keine signifikante Zunahme und können praktisch nicht "geprimt" werden. Für induzierte HL-60 Zellen findet sich 4 bis 6 Tage nach DMSO-Behandlung - bezogen auf ihr Ausgangsniveau ohne PMA-"priming" und ohne einen signifikanten Strahleneffekt - ungefähr eine Verdopplung (ca. 130 - 140% des Niveaus undifferenzierter Zellen) der induzierbaren Gesamt-Aktivität (Abb. 21a). Reife Neutrophile zeigen, bezogen auf ihr Ausgangsniveau ohne PMA-"priming", einen signifikanten PKC-Aktivitätsanstieg um ca. 65% ($p < 0,05$; Abb. 21a). Eine Bestrahlung ohne nachfolgende PMA-Behandlung zeigt nur für induzierte HL-60 Zellen (1 Gy; s.o.) einen signifikanten Effekt ($p < 0,05$) auf die Gesamt-PKC-Aktivität (Abb. 21a). Bei sofortiger Stimulation mit PMA aller drei Zelltypen konnte kein signifikanter Effekt der Bestrahlung gesichert werden (Abb. 21a).

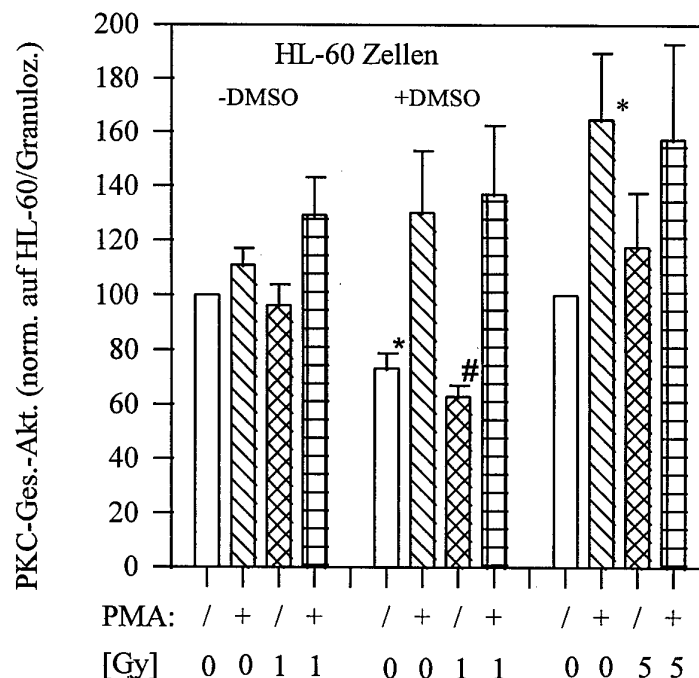


Abb. 21a: PKC-Aktivität nach Differenzierung und/oder Bestrahlung. HL-60 Zellen ohne oder nach 4-6 Tagen DMSO-Behandlung bzw. Granulozyten (4 rechte Säulen) wurden bestrahlt (HL-60, 1 Gy am Tag 0 bzw. Granulozyten 5 Gy unmittelbar vor Stimulation), z.T. sofort mit PMA stimuliert (10 min; PMA-"priming") und aus dem Zellhomogenat die PKC-Aktivität mit Hilfe eines Kits bestimmt (Übertragung einer P-32-markierten Phosphatgruppe auf ein spezifisches Peptid); dargestellt nach Normierung auf die Aktivität undifferenzierter HL-60 Zellen bzw. von Granulozyten (# : signifikanter Strahleneffekt).

Vorstimulation der Zellen mit dem PKC-Agonisten PMA vermag somit offensichtlich in differenziert(er)en Zelltypen noch eine strahlenresistente, Lipid-induzierte Phosphotransferase-Aktivität freizusetzen, die in undifferenzierten Zellen (noch) nicht vorhanden ist.

Die drei Zellarten unterscheiden sich auch hinsichtlich ihres Anteils an nicht-translozierbarer PKC-Aktivität durch PMA-"priming". Nach Fraktionierung der Zellen (ohne PMA-Stimulation) in eine zytosolische und eine Membran-Phase (100.000 x g-Überstand bzw. -Pellet) weisen uninduzierte HL-60 Zellen im Zytosol (Überstand) einen Anteil erfaßbarer PKC-Aktivität von ca. 40% der Gesamtaktivität (Summe aus beiden Fraktionen) auf (Abb. 21b). Vorherige PMA-Behandlung der Zellen senkt den Anteil deutlich auf ca. 13% ($p < 0,01$; "Translokation", s. Kap. 3.1.3; Abb. 21b). Induzierte Zellen verhalten sich ähnlich (ca. 40% vs. ca. 9%; $p < 0,01$), während in Neutrophilen die Grundverteilung von ca. 60% im Überstand durch PMA auf ca. 48% ($p < 0,05$) reduziert wird (Abb. 21b). Ein signifikanter Strahleneffekt auf den Anteil der unstimulierten PKC-Aktivität im Zytosol ergibt sich nur bei induzierten Zellen mit einem Abfall um ca. 20% ($p < 0,05$; 1 Gy vs. 0 Gy; Abb. 21b).

Entsprechend der Strahlenempfindlichkeit hinsichtlich des Parameters Überleben (s. Kap. 3.1.1), zeigen sich auch die stärksten Strahleneffekte bei der Translokationsfähigkeit von PKC-Aktivität an die Membranfraktion bei uninduzierten HL-60 Zellen. Eine Dosis von 1 Gy mit Zellfraktionierung sofort nach der PMA-Stimulation verursacht einen Anstieg des durch PMA nicht translozierbaren Anteils um ca. 33% (von ca. 12% auf ca. 16% der Gesamtaktivität; $p < 0,01$; Abb. 21b), d.h. die Bestrahlung behindert die Translokation dieser PKC-Aktivität. Bei induzierten Zellen, die 4 - 6 Tage zuvor mit 1 Gy bestrahlt worden waren, wird tendenziell eine Verstärkung der an die Membranen translozierenden PKC-Fraktion um ca. 18% (Abfall von ca. 9,2% auf ca. 7,6% Restaktivität im Zytosol) und damit ein umgekehrter, d.h. die Translokation fördernder Strahleneffekt gefunden, der jedoch statistisch nicht gesichert werden konnte. Entsprechend war auch kein signifikanter Effekt mehr bei Neutrophilen, die mit 5 Gy bestrahlt und sofort gemessen wurden, feststellbar (Abfall von ca. 48% auf ca. 45% Restaktivität im Zytosol; Abb. 21b).

Hinsichtlich der Reaktivität auf PMA-Behandlung verhalten sich also DMSO-induzierte HL-60 Zellen z.T. mehr wie uninduzierte Zellen (zytosolischer PKC-Anteil und dessen Translozierbarkeit; Abb. 21b) und hinsichtlich der Ansprechbarkeit der Gesamt-PKC-Aktivität mehr wie reife Granulozyten (Abb. 21a). Die Letzteren sind in Bezug auf die erfaßbare Gesamt-PKC-Aktivität im Vergleich mit induzierten HL-60 Zellen am Tag 5 durch eine etwa zweifach höhere "spezifische" Aktivität (Aktivität pro Proteinmenge) gekennzeichnet (Ergebnis nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse belegen, daß sowohl die PKC-Aktivität als auch ihre "Mobilität" (Translokationsfähigkeit an das vermutete Target/Substrat in der Plasmamembran) durch ionisierende Strahlung z.T. signifikant und persistierend beeinflusst wird, wobei jedoch jeweils nur relativ kleine Effekte beobachtet werden (s. dazu auch Kap. 3.2.1).

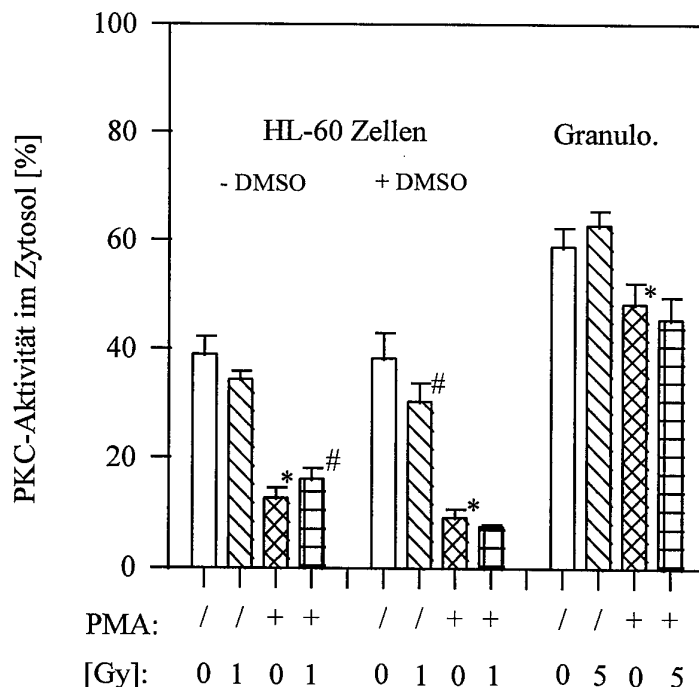


Abb. 21b: PKC-Aktivität nach Differenzierung und/oder Bestrahlung. Zellen und Assay wie in Abb. 21a. Zytosolischer PKC-Anteil (in % der Summe der Aktivitäten aus Zytosol plus Membranfraktion; #: signifikante Strahleneffekte).

3.1.6 Veränderung des F-Actins des Zytoskelettes unter Differenzierung und Bestrahlung

Dem Zytoskelett kommt - wie oben (Kap. 1.1.2 und 1.1.4) ausgeführt - eine große Bedeutung bei der Ausführung von Phagozytenfunktionen zu. Im Einzelnen betrifft dies den Phagozytosevorgang selbst, die Zusammenführung des aktiven NADPH-Oxidase-Komplexes und dessen Regulation an der Plasma-/Phagosomenmembran sowie die Modulation der Expression der Oberflächenrezeptoren (z.B. für Chemotaxine oder Adhäsionsmoleküle; Nauseef et al. 1991; Woodman et al. 1991; Greenberg 1995; Wiles et al. 1995). Es war deshalb auch interessant, die möglichen Einflüsse von Differenzierung und Bestrahlung von HL-60 Zellen auf das Zytoskelett zu analysieren. Dieses wurde modellhaft anhand der Veränderungen des β -Actins als einer Komponente des Zytoskeletts analysiert. Die Untersuchungen erfolgten sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Niveau mit Hilfe des "Northern blot"-Verfahrens und durch Darstellung des filamentären Anteils des Actins ("F-Actin") mit durchflußzytometrischer Analyse der Zellen. F-Actin ist durch eine hohe Affinität für das fluoreszierende Reagenz Nitrobenzoxadiazol (NBD)-Phalloidin gekennzeichnet, das sehr spezifisch an polymerisiertes (F)-Actin, jedoch nicht an monomeres (G)-Actin bindet (Barak et al. 1980; Packman & Lichtman 1990).

Abb. 22 zeigt in einer Zusammenstellung von "Northern blot"-Ergebnissen, daß alleinige Induktion der Differenzierung der Zellen mit DMSO zu einer kontinuierlichen Zunahme der β -Actin-mRNA führt, die nach 48 h das ca. 15-fache des Ausgangswertes undifferenzierter Zellen erreicht und im Laufe der folgenden 3 Tage wieder auf ca. 55% des Maximalniveaus abfällt. Eine der DMSO-Gabe unmittelbar vorausgehende Bestrahlung mit 0,5 Gy oder 1 Gy verursacht innerhalb der ersten ca. 24 h (dosisabhängig) einen beschleunigten Anstieg der β -Actin-mRNA-Gehalte, die nach ca. 24 h ein gegenüber dem Kontrollwert 20-fach erhöhtes Niveau erreichen, um danach im Laufe von 4 Tagen auf ca. 70% ihres Maximalniveaus abzufallen. Der Gehalt an β -Actin-mRNA bestrahlter Zellen liegt dann relativ konstant ca. 30% - 50% über dem der unbestrahlten Kontrollen (Abb. 22). Die Auswertung dieser Versuche wurde durch die regelmäßig beobachtete Degradation der β -Actin-mRNA (s. Kap. 4.1.4) zu den Zeitpunkten 0 - 8 h und > 72 h nach Induktion der Differenzierung außerordentlich erschwert.

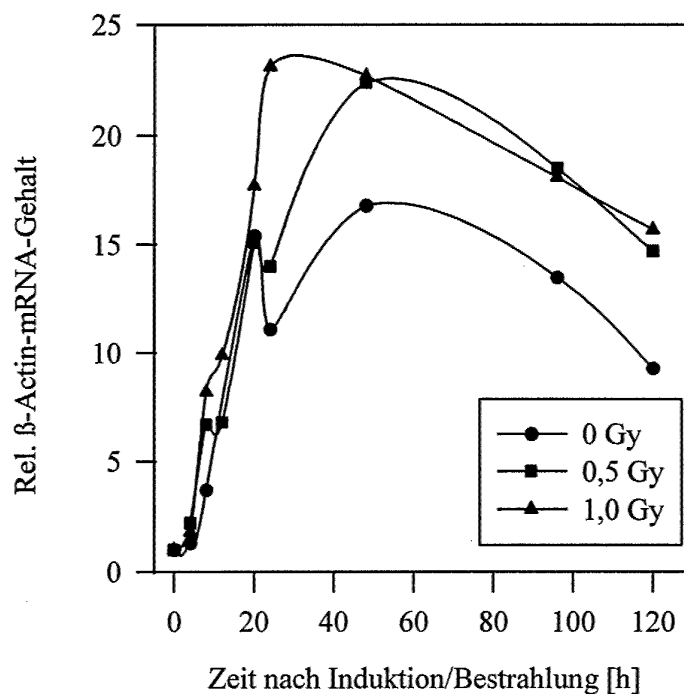


Abb. 22: mRNA-Gehalt für β -Actin unter Differenzierung und Differenzierung plus Bestrahlung. Die Gesamt-RNA aus HL-60 Zellen nach DMSO-Behandlung und Bestrahlung mit 0,5 Gy oder 1 Gy wurde extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Eine Gensonde (Exon 4) einer humanen β -Actin-cDNA wurde in vitro mit radioaktivem CTP (α -P32-CTP) markiert und zur Hybridisierung mit der auf eine Nylonmembran transferierten RNA ("Northern blot") eingesetzt. Der Schwärzungsgrad der β -Actin-spezifischen mRNA-Bande ($\sim 1,8$ kB) des exponierten Röntgenfilms wurde Laserdensitometrisch ausgewertet, und die Werte unter Berücksichtigung der zugehörigen relativen 18S-rRNA-Mengen auf die unbestrahlten HL-60 Zellen zum Zeitpunkt 0 h normiert.

Da die zelluläre Menge eines bestimmten Proteins nicht nur von der transkriptionellen, sondern auch von der translationellen und Degradations-Aktivität der Zellen abhängt, wurden die o.g. Untersuchungen auf mRNA-Niveau durch Darstellung des relevanten fertigen Proteins ergänzt.

Die durchflußzytometrische Analyse des F-Actin-Gehaltes nach NBD-Phalloidin-Färbung der Zellen ergab relativ homogene Verteilungen (s. Abb 24a, Histogramm I) unbestrahlter und nicht mit f-MLP stimulierter HL-60 Zellen. Dies gilt für Zellen mit und ohne Induktion der Differenzierung und zu jedem Zeitpunkt der Kultur. Jedoch anders als die Veränderungen der β -Actin-mRNA (s.o.), sind die Effekte der Induktion zur Differenzierung alleine und von Differenzierung plus Bestrahlung auf F-Actin-Proteinebene sehr viel schwächer ausgeprägt und zeigen Zunahmen bis maximal zum 1,6-fachen des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 48 h nach Bestrahlung mit 1 Gy (Abb. 23). Diesem Anstieg geht im Zeitraum bis 24 h nach DMSO-Gabe/Bestrahlung zunächst ein F-Actin-Abbau voraus, der nach 16 h ein Minimum bei ca. 80% des Ausgangsniveaus durchläuft (Abb. 23). Zwischen den Zeitpunkten 48 h und 120 h wird ein relativ stabiles Niveau des F-Actin-Gehaltes der Zellen auf ca. 140% beobachtet, wobei die bestrahlten Zellen (0,5 Gy oder 1 Gy zum Zeitpunkt 0 h appliziert) ca. 10% - 20% höhere Werte als die Kontrollen aufweisen (Abb. 23).

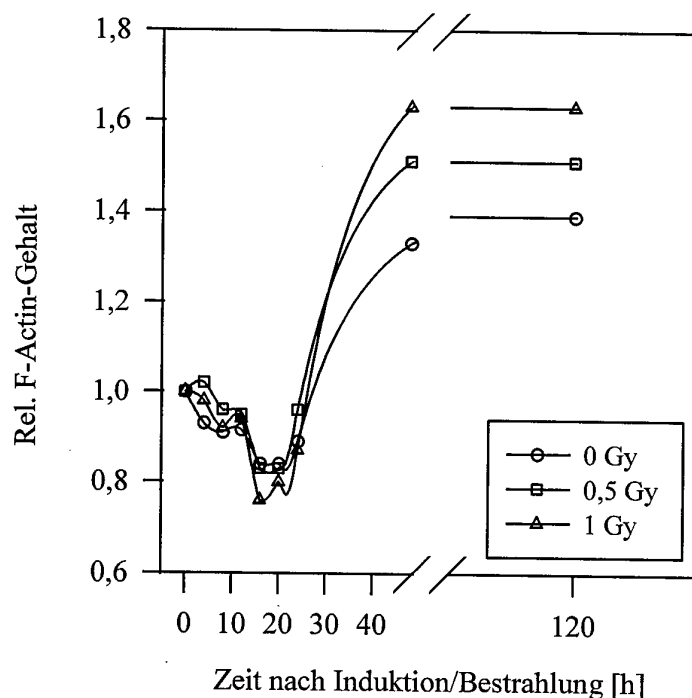


Abb. 23: F-Actin-Gehalt unter Differenzierung und Differenzierung plus Bestrahlung. HL-60 Zellen nach DMSO-Behandlung und Bestrahlung mit 0,5 Gy oder 1 Gy wurden mit NBD-Phalloidin inkubiert und - nach Normierung auf den Wert von Kontrollzellen - der F-Actin-Gehalt der Zellen als mittlere Fluoreszenzintensität der Population dargestellt.

Da von Neutrophilen bekannt ist (Howard & Oresajo 1985a; Packman & Lichtman 1990), daß sie auf f-MLP-Behandlung sehr schnell mit einer Polymerisation von G-Actin reagieren, war es auch interessant, die mögliche Reaktion des F-Actin-Gehaltes von HL-60 Zellen und deren Kinetik auf diesen Stimulus der "respiratory burst"-Aktivität zu prüfen. Abb. 24 zeigt, daß HL-60 Zellen (7 d nach DMSO-Behandlung) ebenfalls sehr schnell und relativ homogen auf eine Stimulation mit f-MLP reagieren. Das Maximum der Reaktion mit einer ungefähren Verdopplung der mittleren Fluoreszenzintensität wird - ähnlich der von Neutrophilen (Howard & Oresajo 1985a; Packman & Lichtman 1990; Johansson et al. 1995) - bereits 30 sec nach Zugabe des Agonisten erreicht (Abb. 24). Danach folgt eine Aufspaltung der Population in zwei etwa gleichstarke Anteile zum Zeitpunkt 5 min nach Stimulation, wobei der eine Anteil auf dem erhöhten F-Actin-Niveau nach 30 sec verbleibt und der andere unter das mittlere Ausgangsniveau absinkt (Abb. 24). Dieser Effekt einer Stimulation der Zellen mit f-MLP auf den F-Actin-Gehalt wird von einer vorausgegangenen Bestrahlung (4 Gy, 0 - 24 h zuvor) nicht beeinflusst (Ergebnis nicht gezeigt).

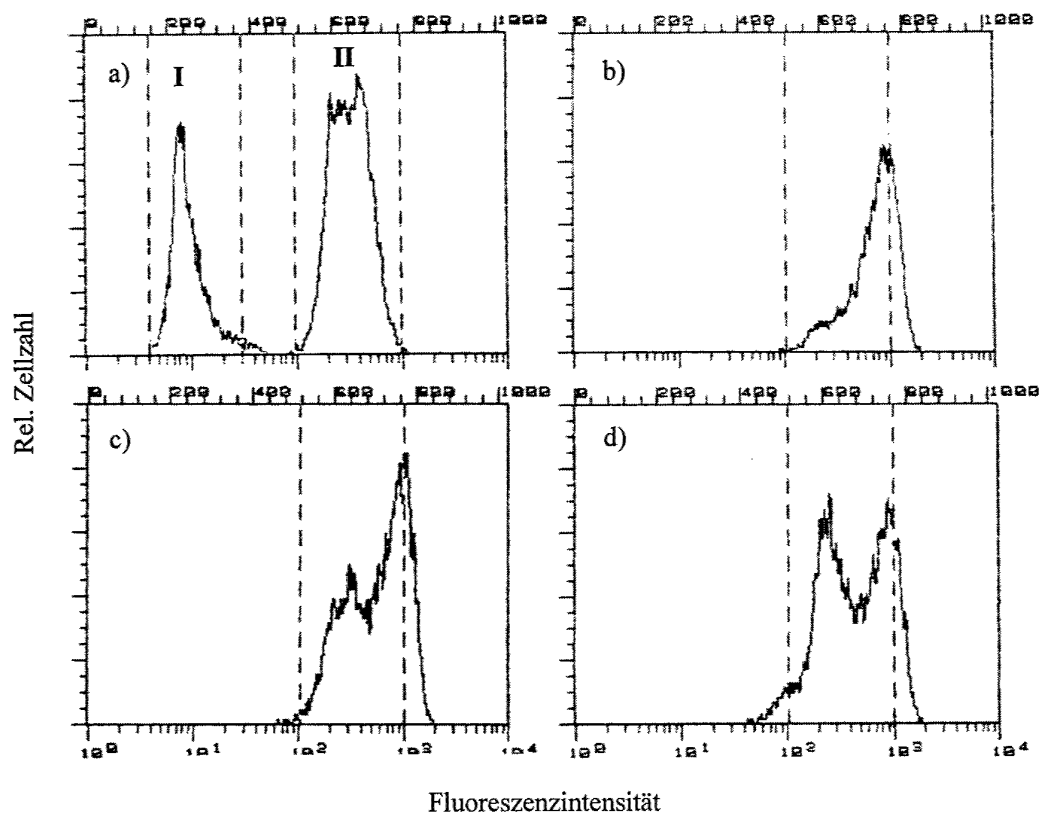


Abb. 24: Reaktion des F-Actin-Gehaltes auf eine Stimulation von HL-60 Zellen mit f-MLP. Die Zellen wurden 7 d nach DMSO-Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ f-MLP stimuliert und der F-Actin-Gehalt mit NBD-Phalloidin-Färbung durchflußzytometrisch bestimmt. a) Negativkontrolle (ohne NBD-Phalloidin, Histogramm I) und unstimulierte Zellen (Histogramm II), b) 0,5 min, c) 3 min und d) 5 min nach f-MLP-Stimulation NBD-Phalloidin-markierter Zellen.

Mit diesen Ergebnissen ist in HL-60 Zellen modellhaft die grundsätzliche Beeinflußbarkeit einer wichtigen Komponente des Zytoskeletts [(F)-Actin] auf mRNA- und Protein-Niveau durch ionisierende Strahlung ebenso belegt wie die Reaktivität dieses Elementes des Zytoskeletts auf einen Stimulus der "respiratory burst"-Reaktion der Zellen.

3.2 Signaltransduktionswege zur Auslösung der "respiratory burst"- Aktivität und ihre Strahlensensitivität

In den zuvor vorgestellten Untersuchungen (Kap. 3.1) war die grundsätzliche Vergleichbarkeit von reifen Granulozyten des peripheren Blutes mit HL-60 Zellen nach 4 bis 7 Tagen der DMSO-induzierten Differenzierung aufgezeigt worden. Bei den nachfolgenden Ergebnissen handelt es sich überwiegend um Befunde, die entweder am einen oder dem anderen Zelltyp erhoben wurden.

Drei für die Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion bedeutsame Wege der Signaltransduktion wurden geprüft (vgl. Abb. 4). 1. Der Phorbolester PMA initiiert die Aktivierung der NADPH-Oxidase ohne Beteiligung eines Membran-ständigen Rezeptors durch Bindung an PKC-Isoenzyme. 2. Das formylierte Tripeptid f-MLP, als Vertreter eines Chemoattraktans-Liganden, die über Bindung an heptahelikale Membran-Rezeptoren wirken, benötigt zur Signalübertragung die Beteiligung von heterotrimeren "G-Proteinen". 3. Immunkomplex-vermittelte Aktivierung über bei der Phagozytose beteiligte Rezeptoren (FcγR) benötigt die Aktivität von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) zur Signalweiterleitung. Die hier vorzustellenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zu den jeweiligen exakten Mechanismen der Signalübertragung und deren mögliche Strahlensensibilität leisten.

Der Versuch der Aufklärung der Mechanismen geschieht überwiegend durch pharmakologische Modulation (mittels etablierter Inhibitoren) von Enzymen, die vermutlich an den zu untersuchenden Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Solche Inhibitoren haben sich in der Vergangenheit als extrem hilfreich bei der Aufklärung dieser Prozesse erwiesen (vgl. z.B. Nakanishi et al. 1995; Powis et al. 1995). Soweit nicht extra aufgeführt, sind alle eingesetzten Antagonisten hinsichtlich ihrer Hemmwirkung, ihrer potentiellen Zytotoxizität und hinsichtlich ihrer Applikationszeit für eine optimale Inhibition selbst getestet. "Lösungsmittel-Kontrollen" dienten bei Lösungsmitteln (DMSO, DMF, Chloroform, etc.) für Inhibitoren der Überprüfung möglicher unerwünschter und überlagernder Einflüsse der organischen Lösungsmittel auf die gemessenen Effekte. Es werden - soweit möglich - jeweils zusätzlich die für eine 50%-ige Inhibition notwendigen Konzentrationen der Hemmstoffe (IC₅₀) angegeben.

3.2.1 Allgemeines zu Strahleneffekten

Die nachfolgend in diesem Abschnitt (Kap. 3.2) beschriebenen Strahleneffekte wurden bei zwei verschiedenen Bestrahlungsmodellen gefunden:

1. Effekte nach akuter Bestrahlung von isolierten Granulozyten in vitro (zeitlicher Abstand zwischen Bestrahlung und Messung: Minuten bis eine Stunde) und
2. Effekte 4 bis 6 Tage nach Bestrahlung von HL-60 Zellen. Die Bestrahlung wurde dabei unmittelbar vor der Induktion der Differenzierung durchgeführt.

Während es sich im ersten Fall wahrscheinlich um akute Strahlenwirkung ohne die Auswirkung(en) einer genetischen Verankerung handelt, ist im zweiten Fall von einer genetischen Manifestation des beobachteten Strahleneffektes auszugehen.

Die hauptsächlich angewandten Verfahren (Durchflußzytometrie oder Chemoluminometrie) zur Messung der "respiratory burst"-Reaktion zeichnen sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Sie sollten sich somit grundsätzlich zur Messung der Effekte relativ kleiner Strahlendosen eignen. Dies zeigte sich bereits in den beobachteten Veränderungen der schwachen Fluoreszenz- bzw. Chemolumineszenzsignale unstimulierter Zellen, bei denen eine Verdopplung der Meßwerte (ca. 210% der Kontrollen) nach Bestrahlung der Granulozyten mit 5 Gy in der Durchflußzytometrie gefunden wird (Ergebnisse nicht gezeigt). Dabei macht es keinen Unterschied, ob die Bestrahlung in Anwesenheit des Indikators DHR 123 erfolgte oder ob dieser erst nach der Bestrahlung zugefügt wurde.

Strahleneffekte auf die stimulierten "respiratory burst"-Reaktionen isolierter Granulozyten zeigt die Abb. 25. Bestrahlung der Zellen mit 5 Gy mit unmittelbar nachfolgender Chemoluminometrie unter PMA-Stimulation zeigt reproduzierbar eine ca. 6%-ige Reduktion ($p < 0,05$) der Lichtausbeute ($n = 4$), während die Reaktion nach f-MLP-Stimulus unverändert ist ($99,7 \pm 5,9\%$; $n = 5$) und die durch Immunkomplexe induzierte Reaktion nicht signifikant um ca. 5% abnimmt ($n = 5$; Abb. 25).

Sehr viel deutlicher wird dagegen die Strahlenempfindlichkeit von Fc γ R-vermittelter "respiratory burst"-Aktivität nach Bestrahlung von Granulozyten mit 5 Gy in der durchflußzytometrischen Analyse. Dabei wurden die Zellen entweder vor oder nach der Bestrahlung mit gepooltem Humanserum inkubiert. Anschließend erfolgte die Quervernetzung der gebundenen Antikörpermoleküle mit F(ab')₂-Fragmenten eines anti-human IgG-Antikörpers ("linker"). Alternativ wurden die Zellen mit Immunkomplexen (s. Kap. 2.7.1.4) stimuliert. Unter allen Bedingungen kommt es zu einer Inhibition der Reaktivität bestrahlter Zellen, die im Falle des Humanserums unabhängig von der Quervernetzung 40% - 45% ($p < 0.01$; $n = 10 - 12$) beträgt und bei den Immunkomplexen ca. 20% ($p < 0.05$; $n = 6$) ausmacht (Abb. 25).

Mit diesen Ergebnissen ist die grundsätzliche Strahlenempfindlichkeit der "respiratory burst"-Reaktion von Granulozyten und insbesondere die der FcγR-vermittelten Signaltransduktionswege aufgezeigt.

In weiteren Experimenten wurde versucht, mögliche Elemente der Signaltransduktion zur Auslösung der "respiratory burst"-Aktivität und damit potentielle Targets der Strahlung genauer zu identifizieren. Dazu wurde zunächst die grundsätzliche Beteiligung des Elektronen-übertragenden Enzyms, der NADPH-Oxidase, bei den angewandten Meßverfahren geprüft.

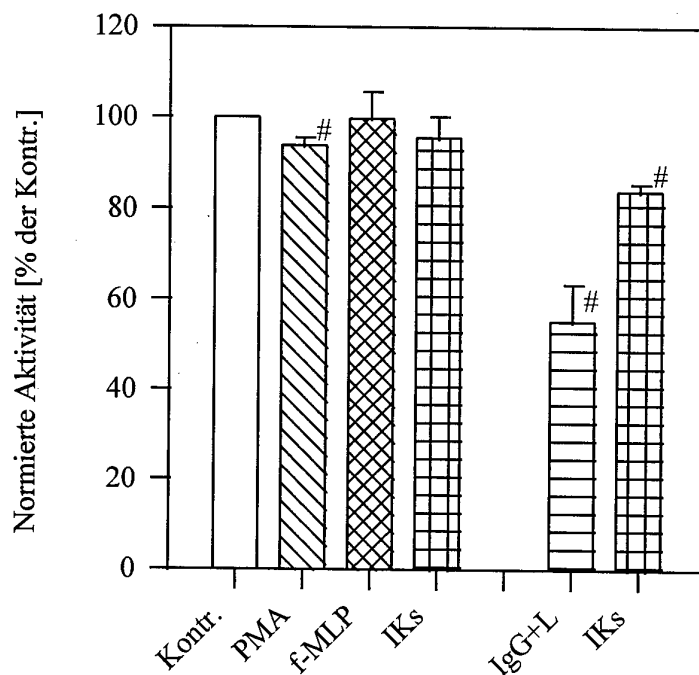


Abb. 25: Strahleneffekte auf die "respiratory burst"-Aktivität von Granulozyten. Isolierte Granulozyten wurden mit 5 Gy bestrahlt und mit PMA, f-MLP, Immunkomplexen (IKs) oder Humanserum (IgG) stimuliert. Die Messung erfolgte chemoluminometrisch (4 linke Säulen) oder durchflußzytometrisch (beide rechten Säulen), hier nach Stimulation mit Humanserum [+ anti-human IgG, "linker"(L)] oder IKs im Vergleich zu scheinbestrahlten Kontrollzellen.

3.2.2 "Respiratory burst"-Oxidase

Die Spezifität einer vermuteten "respiratory burst"-Reaktion kann durch Verwendung eines spezifischen Inhibitors der NADPH-Oxidase, Diphenylenjodonium-Jodid (DPI; Robertson et al. 1990; Stuehr et al. 1991; Trudel et al. 1991) geprüft werden. Dabei zeigt sich ein dosisabhängiger Effekt. Der Enzymkomplex ist durch Vorinkubation der Zellen mit 50 µM

DPI für 5 min vor Stimuluszugabe komplett inhibierbar (Abb. 26). Dies gilt für alle drei getesteten Stimuli in vitro. Die in Abb. 26a dargestellten Restaktivitäten nach DPI-Vorbehandlung der Zellen entsprechen denen der Scheinstimulationen mit Puffer (Ergebnisse nicht gezeigt). Die IC_{50} -Konzentrationen betragen in der Reihenfolge der Stimuli PMA, f-MLP und Immunkomplexe ca. 8 μ M, 5 μ M und 18 μ M DPI. Sie liegen damit in der Größenordnung publizierter Werte (Robertson et al. 1990).

Die Aktivität der "respiratory burst"-Oxidase ist also für die gemessene Oxidation der Fluorochroms DHR 123 verantwortlich.

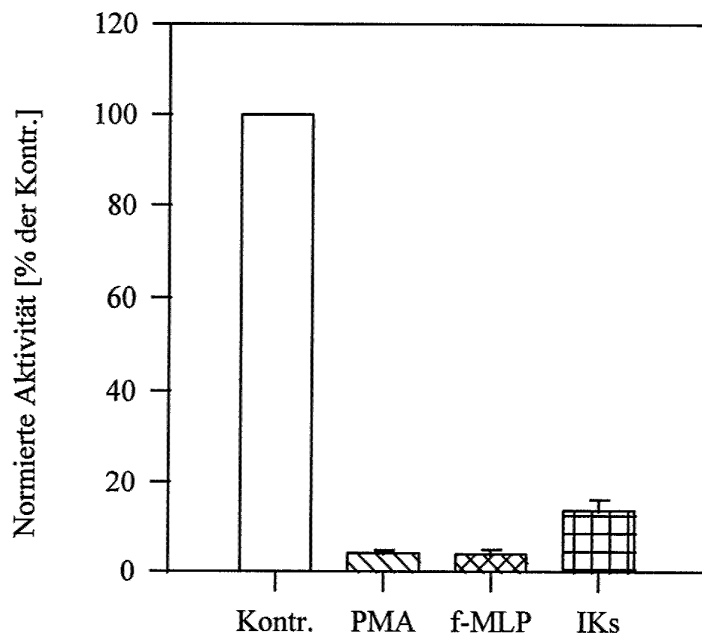


Abb. 26a: Beteiligung der NADPH-Oxidase bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit einem Inhibitor von NADPH-Oxidase-Aktivität, Diphenyljodonium-Jodid (50 μ M) 5 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen (IKs) durchflußzytometrisch bestimmt.

Die drei eingesetzten Stimuli der "respiratory burst"-Oxidase aktivieren den Oxidase-Enzymkomplex mit verschiedenen Kinetiken und mit unterschiedlichem Ausmaß. Abb. 26b zeigt beispielhaft, aber repräsentativ, für einen Spender die gegenüber dem f-MLP-Stimulus etwas verzögerte Reaktion der PMA- oder Immunkomplex-Antwort in peripheren Granulozyten in der Luminol-abhängigen Chemolumineszenzanalyse sowie die deutlichen quantitativen Differenzen. Sie verhalten sich bei Granulozyten als Integral des Chemolumineszenzsignals über 50 min typischerweise ca. wie 100% (PMA) zu 45% (f-MLP) zu 20% (Immunkomplexe) und bei HL-60 Zellen nach 4-6 Tagen der Differenzierung ca. wie 100% zu 10% zu 15% (Ergebnisse nicht gezeigt).

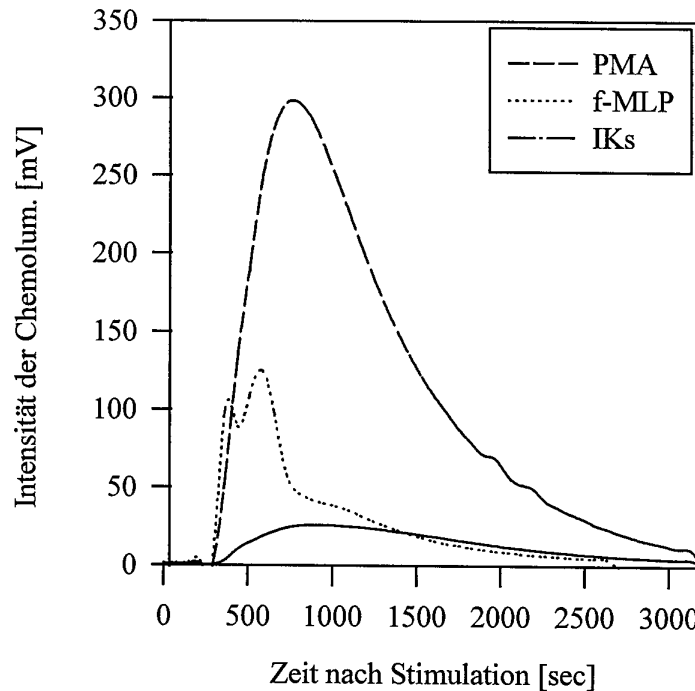


Abb. 26b: Kinetiken der Reaktion nach PMA-, f-MLP- bzw. Immunkomplex-(IKs)-Stimulation von Granulozyten in der Luminometrie.

3.2.3 Protein Kinase C-Aktivität

Der PKC-Aktivität wird eine große Bedeutung bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion beigemessen (Lambeth 1988; Dewald et al. 1989; Thelen et al. 1993), die mittels direkter Stimulation der Enzymaktivität durch PMA (Hecker 1978) bzw. auch durch f-MLP induzierbar sein soll (Sha'afi & Molski 1988).

Die Beteiligung von PKC-Aktivität an der Aktivierung der Immunreaktion kann durch PKC-Inhibition mittels des Alkaloids Staurosporin (Tamaoki et al. 1986; Dewald et al. 1989; Badwey et al. 1991; Goodman & Tenner 1992) oder mittels der Verbindung 1-(5-Isoquinoliny-Sulfonyl)-2-Methylpiperazin ("H-7"; Hidaka et al. 1984; Hallahan et al. 1992) getestet werden.

Vorinkubation der Granulozyten mit Staurosporin zeigt einen konzentrationsabhängigen Effekt, wobei durch Behandlung der Zellen mit 200 nM Staurosporin für 5 min vor Stimulation sowohl die PMA- wie die Formylpeptid-induzierte Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase komplett gehemmt werden kann (Abb. 27). Stimulus-unabhängig liegt die IC_{50} -Konzentration von Staurosporin in Übereinstimmung mit Lund & Olweus (1992) bei ca. 25 nM.

Dagegen führt eine 5-minütige Vorinkubation von Granulozyten mit 200 μ M H-7, das ebenso wie Staurosporin (Tamaoki et al. 1986) mit ATP um die Bindungsstelle am Enzym konkurrieren soll (Hidaka et al. 1984; Ding & Badwey 1993), zu Konzentrations- und Stimulus-abhängigen Effekten. Der f-MLP-induzierte "burst" wird nahezu komplett inhibiert (Restaktivität: ca. 15%), während nach PMA-Applikation bzw. Stimulation der Zellen mit Immunkomplexen nur eine Inhibition von ca. 50% bzw. 70% gelingt (Abb. 27). Die IC_{50} -Konzentrationen betragen - in der Reihenfolge: f-MLP, PMA, Immunkomplexe - ca. 80 μ M, 180 μ M und 135 μ M H-7.

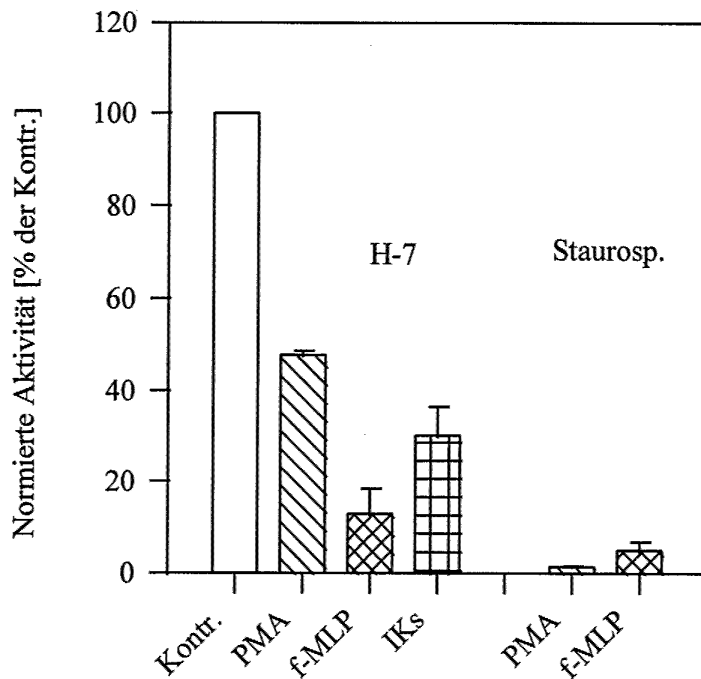


Abb. 27: Beteiligung von Proteinkinase C-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit Inhibitoren von PKC-Aktivität, Staurosporin oder H-7 (200 nM bzw. 200 μ M), 5 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen (IKs) durchflußzytometrisch bestimmt.

In Übereinstimmung mit der inhibitorischen Wirkung von H-7 auf die PMA-vermittelte Reaktion kann durch den Antagonisten auch die PMA-stimulierte Erhöhung des Phosphorylierungsgrades an Tyrosinresten von Proteinen (siehe Kap. 3.2.5) völlig aufgehoben werden (Ergebnis nicht gezeigt).

PKC-Aktivität ist also für die "respiratory burst"-Antwort der Zellen sehr wichtig.

3.2.3.1 Strahleneffekte auf Reaktionswege mit direkter PKC-Aktivierung durch PMA

Eine Bestrahlung mit 2 Gy am Tag 0 führt nach PMA-Stimulation der HL-60 Zellen zu einer Reduktion NBT-positiver Zellen über praktisch den gesamten Untersuchungszeitraum nach Induktion der Differenzierung, die im Durchschnitt der Tage 3 bis 7 nach Bestrahlung ca. 30% der Kontrollen beträgt (Abb. 28; ● - Sendler et al. 1993).

Im chemoluminometrischen Assay wird unter den o.g. Bestrahlungsbedingungen bei HL-60 Zellen die Lichtmenge im Durchschnitt der Meßzeitpunkte (3 bis 7 d nach Induktion der Differenzierung) um ca. 16% (Bereich: 0 bis 33%) reduziert (Abb. 28; ■) und gleichzeitig der Maximalwert ihrer Produktion leicht um durchschnittlich 80 sec verlangsamt (Ergebnis nicht gezeigt).

Durchflußzytometrisch bestimmt, wird bereits nach Dosen von 0,5 Gy (Ergebnis nicht gezeigt) oder 1 Gy (Abb. 28; ▲) in HL-60 Zellen unter DMSO-Induktion die PMA-stimulierbare "respiratory burst"-Reaktion zwischen den Tagen 4 und 6 um durchschnittlich 50% reduziert (Kaffenberger & van Beuningen 1994).

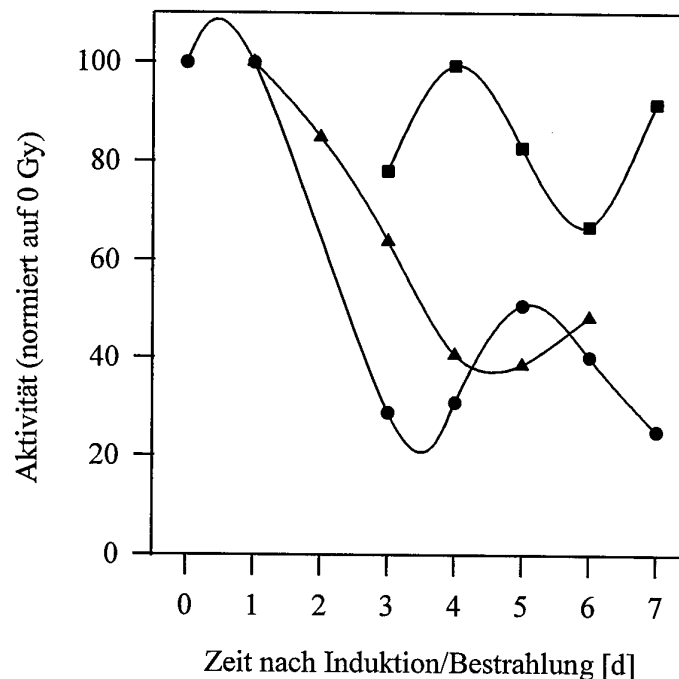


Abb. 28: Strahlenwirkung auf Phorbol ester-aktivierte Signalübertragungswege. HL-60 Zellen wurden am Tag 0 mit 2 Gy oder 1 Gy bestrahlt, unmittelbar danach mit 1,25% DMSO zur Differenzierung zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Stimulation mit PMA a) der NBT-Test (●), b) eine chemoluminometrische (■) oder c) eine durchflußzytometrische [1 Gy (▲)] Bestimmung des "respiratory burst" durchgeführt. Alle Daten sind auf die unbestrahlten Kontrollen normiert.

Damit ist in Einengung der möglichen Signaltransduktionswege zur Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase die Strahlenempfindlichkeit von PMA-induzierten und damit PKC-abhängigen "Pathways" auch in differenzierenden HL-60 Zellen deutlich belegt.

3.2.4 Phospholipasen

Phospholipasen werden von HL-60 Zellen bereits vor der Induktion der Differenzierung sowie danach auf Protein-Niveau stabil exprimiert. Abb. 29 zeigt in einer Zusammenstellung von "Western blot"-Ergebnissen die Expression der Phospholipasen $C\beta_1$ und $-\gamma_1$ sowie von A_2 mit den Molekulargewichten von ca. 134 kD bzw. 146 kD sowie ca. 100 kDa. Diese Expression wird durch eine Reihe verschiedener experimenteller Manipulationen (Stimulation mit f-MLP $\pm$ CytB oder PMA; Hungern der Zellen für 24 h; etc.; "lanes" 1 - 7) einschließlich der Bestrahlung nicht signifikant beeinflusst. Sie werden deshalb hier ebenso wie in Abb. 34 (s. Kap. 3.2.5) nicht im Detail aufgeführt.

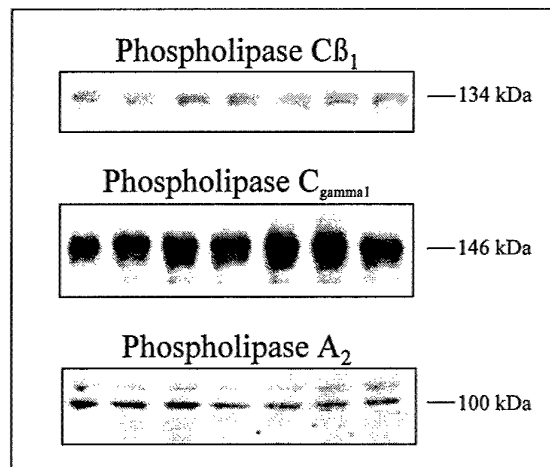


Abb. 29: Expression von Phospholipasen in HL-60 Zellen. HL-60 Zellen (4 - 5 Tage nach Induktion der Differenzierung) wurden lysiert und die denaturierten Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach elektrischem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte der Nachweis mittels spezifischer Antikörper gegen PLC β_1 und $-\gamma_1$ sowie PLA $_2$ im "Western blot"-Verfahren mit "enhanced chemiluminescence" (zu den "lanes" siehe Text).

3.2.4.1 Phospholipasen C

Die Familie der PtdIns-abhängigen Phospholipasen (PL) C umfaßt wenigsten 14 Mitglieder in 4 Hauptklassen (α , β , γ , δ ; Powis et al. 1995), wobei aus dieser Familie nur die PLC $\beta_{1/2}$ und $-\gamma_1$ sowie eine PtdCho-abhängige PLC für diese Studie von Relevanz sind.

3.2.4.1.1 Phosphatidylinositol-abhängige Phospholipase C (PtdIns-PLC)

Das Aminosteroid 1-[6-{{[17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino}hexyl}-1H-pyrrole-2,5-dionel, Kurzbezeichnung: "U73122", wird als spezifischer Inhibitor von G-Protein-vermittelter PtdIns-PLC-Aktivität (PLC β_2) angesehen (Smith et al. 1990; Yule and Williams 1992; Powis et al. 1995), wogegen die strukturell ähnliche Substanz U73343 als PtdIns-PLC-Inhibitor unwirksam sein soll (Bleasdale et al. 1990). Stimulation von Granulozyten mit f-MLP nach vorheriger Inkubation für 10 min mit 2,5 μ M U73122 führt zu einer nahezu kompletten Inhibition der "burst"-Aktivität (Abb. 30). Parallelansätze mit 2,5 μ M U73343 zeigen keinerlei inhibitorischen Effekt auf die durchflußzytometrische Aktivitätsbestimmung (Ergebnisse nicht gezeigt).

Auch die PMA-aktivierte "respiratory burst"-Reaktion kann durch 2,5 μ M U73122, jedoch ebenfalls nicht durch U73343, praktisch total inhibiert werden (Abb. 30). Die IC₅₀-Konzentration von U73122 liegt für beide Stimuli bei ca. 1,5 - 2,0 μ M. Die durch Immunkomplexe ausgelöste Oxidase-Reaktivität der Granulozyten kann nur zu ca. 50% durch die entsprechende Konzentration des PLC(β_2)-Antagonisten inhibiert werden (Abb. 30); die IC₅₀-Konzentration beträgt somit ca. 2,5 μ M.

Die Ergebnisse zeigen damit die Notwendigkeit von PtdIns-PLC-Aktivität bei der Auslösung des "respiratory burst" über drei verschiedene Signaltransduktionswege.

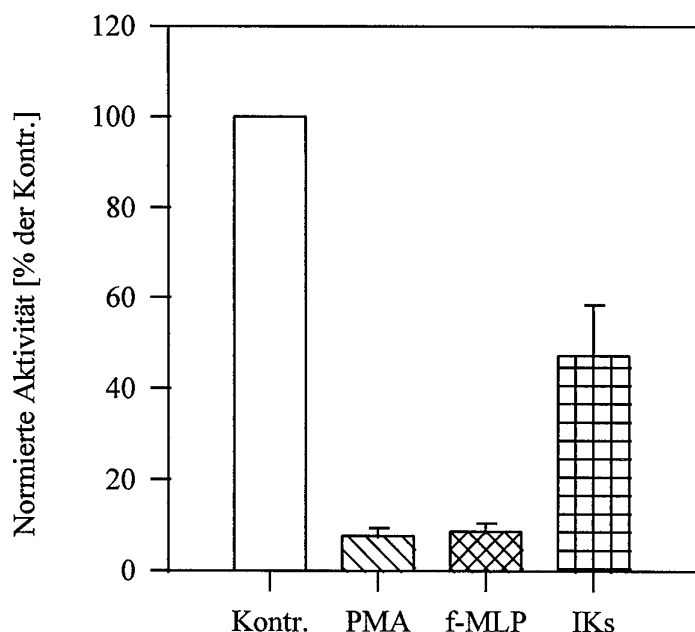


Abb. 30: Beteiligung von PtdIns-abhängiger Phospholipase C (PtdIns-PLC)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit einem Inhibitor von PtdIns-PLC-Aktivität, U73122 (2,5 μ M), 10 min vorinkubiert und die Inhibition der Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen (IKs) durchflußzytometrisch bestimmt.

3.2.4.1.2 Phosphatidylcholin-abhängige Phospholipase C (PtdCho-PLC)

In jüngster Zeit ergeben sich zunehmend Hinweise auf eine Beteiligung von PtdCho-PLC-Aktivität bei der Generierung von intrazellulären mitogenen Signalen durch Zytokine (Pettitt et al. 1994; Sands et al. 1994; Bjørkøy et al. 1995), die mit PKC-Aktivität und der Freisetzung von Lipid-"2nd messenger" einhergehen.

Bei der Ähnlichkeit der zu NADPH-Oxidase-Aktivität führenden Signaltransduktionsprozesse wurde auch hierbei eine PtdCho-PLC-Mitwirkung postuliert und entsprechende Experimente angestellt. Der Inhibitor Tricyclodecan-9-yl Xanthogenat, (Kurzbezeichnung: "D609"), wird als spezifisch für PtdCho-PLC-Aktivität angesehen (Schütze et al. 1992, Büscher et al. 1995). Vorinkubation der Granulozyten für 30 min mit 50 µg/ml D609 führt im Chemolumineszenzassay mit Luminol zu einer Reduktion der Lichtausbeute um ca. 55%, 45% bzw. 75% nach PMA-, f-MLP/CytB bzw. Immunkomplex-Stimulation der Zellen (Abb. 31). Die entsprechenden IC₅₀-Konzentrationen von D609 wurden zu ca. 60 µg/ml, 45 µg/ml und 20 µg/ml abgeschätzt (n = 2).

Damit könnte auch eine Beteiligung von PtdCho-PLC-Aktivität bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion der Granulozyten - besonders nach Stimulation der Zellen mit Immunkomplexen - in Betracht gezogen werden.

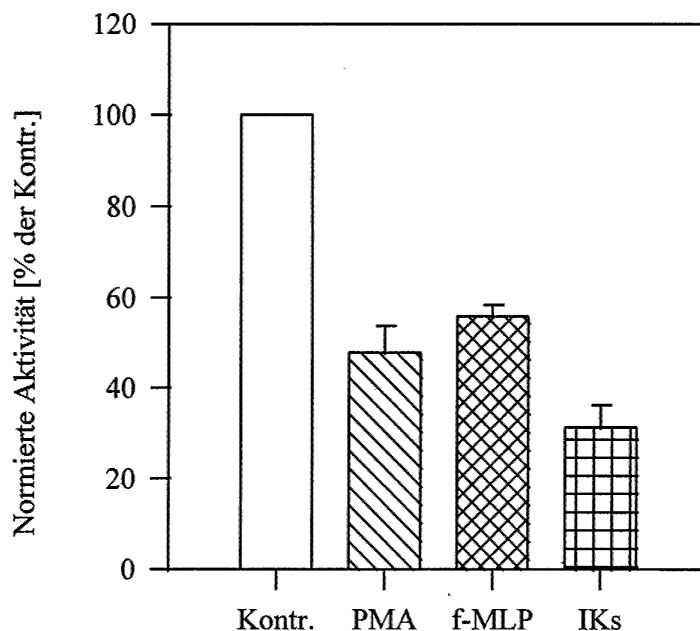


Abb. 31: Beteiligung von PtdCho-abhängiger Phospholipase C (PtdCho-PLC)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit einem Inhibitor von PtdCho-PLC-Aktivität, D609 (50 µg/ml), 30 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen (IKs) luminometrisch bestimmt.

PtdCho-PLC-Aktivität ist bis zu der getesteten Dosis von 5 Gy bei Granulozyten - auch nach Stimulation der Zellen mit Immunkomplexen - nicht strahlenempfindlich (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2.4.2 Phospholipase A₂

Eine Phospholipase A₂ (PLA₂)-Aktivität wird bei der Auslösung des "respiratory burst" diskutiert, die Mechanismen ihrer Aktivierung und Signaltransduktion sind jedoch weitgehend ungeklärt (vgl. z.B. Cockcroft 1992; Thelen et al. 1993).

Als etablierte Inhibitoren von PLA₂-Aktivität gelten das Antimalariamittel Mepacrin (auch unter der Bezeichnung "Quinacrin"; Maridonneau-Parini et al. 1986; Tsunakawi & Nathan 1986; Rao et al. 1993; Hallahan et al. 1994) und das Methylxanthin-Derivat Pentoxifyllin ("Trental®"; Strieter et al. 1988; Bianco et al. 1991, Hallahan et al. 1994).

Eine 10-minütige Vorbehandlung der Zellen mit Mepacrin zeigt konzentrationsabhängige Effekte und führt bei 50 µM Mepacrin sowohl nach PMA- als auch nach f-MLP-Stimulation der Granulozyten zu einer ca. 6%- bzw. 10%-igen Restaktivität der "respiratory burst"-Reaktion, die im Bereich des Scheinstimulationseffektes liegt (Abb. 32). Die IC₅₀-Konzentrationen betragen ca. 18 µM bzw. 25 µM Mepacrin.

Konzentrationsabhängigkeit zeigt sich auch bei Verwendung von Pentoxifyllin. Zu einer praktisch kompletten Inhibition des "respiratory burst" mit Pentoxifyllin sind Konzentrationen im mM-Bereich notwendig, z.B. 5 mM nach 10 min Vorinkubation der Granulozyten, um die Effekte der Stimuli f-MLP bzw. PMA zu antagonisieren (Abb. 32). Die Aktivitäten beider Stimuli werden in etwa gleich stark inhibiert; die IC₅₀-Konzentrationen liegen bei ca. 1,0 bis 2,0 mM Pentoxifyllin.

Mit beiden PLA₂-Antagonisten gelingt auch die vollständige Inhibition der durch Immunkomplexe stimulierten "burst"-Reaktion (Ergebnis nicht gezeigt).

[Ein weiterer Inhibitor von PLA₂-Aktivität, das Arachidonsäure-Analogon DEDA (7,7-dimethyl-5,8-eicosadienoic acid; Lister et al. 1989), konnte bei diesen durchflußzytometrischen Analysen mit DHR 123 nicht eingesetzt werden, da bereits geringe DEDA-Konzentrationen von 1 bis 10 µM ohne Stimulation der Zellen zu starken oxidativen Prozessen führten (Ergebnisse nicht gezeigt).]

Inhibition von PLA₂-Aktivität durch Mepacrin oder Pentoxifyllin führt also zu einer vollständigen Blockierung der durch alle drei Stimuli vermittelten "respiratory burst"-Reaktion in Granulozyten.

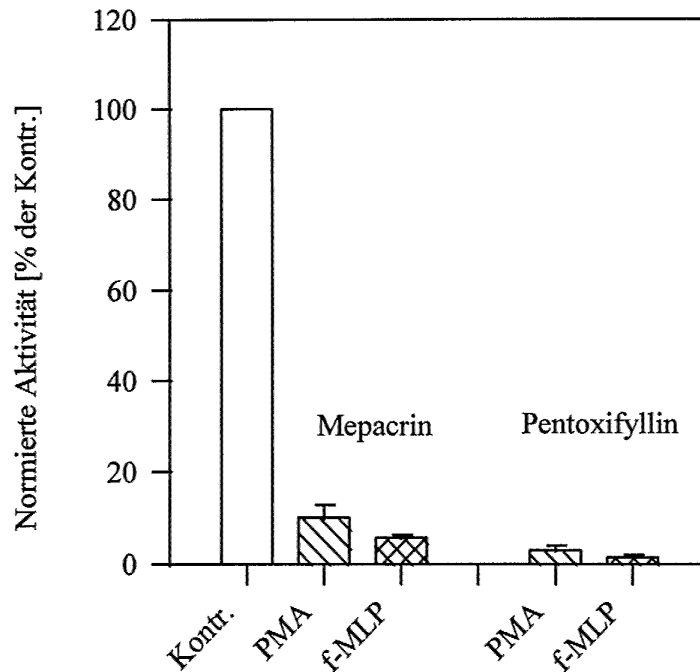


Abb. 32: Beteiligung von Phospholipase A₂ (PLA₂)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit den Inhibitoren von PLA₂-Aktivität, Mepacrin (50 µM) oder Pentoxifyllin (5 mM), 10 min vorinkubiert und die Inhibition der Reaktion nach Stimulation der Zellen mit f-MLP oder PMA durchflußzytometrisch bestimmt.

3.2.5 Protein-Tyrosin-Kinase- und -Phosphatase-Aktivitäten

In jüngerer Zeit finden mögliche Beteiligungen von Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)- bzw. Protein-(Tyrosin)-Phosphatase (PTP)-Aktivitäten an der Regulation der "respiratory burst"-Reaktion zunehmend Akzeptanz (Garland 1992; Lu et al. 1992 und 1993; Azuma et al. 1993).

Die konstitutiven Aktivitäten dieser Enzymfamilien können durch die Darstellung intrazellulärer Phosphorylierungen an Tyrosinresten mittels eines spezifischen anti-Phosphotyrosin-Antikörpers und deren Modulation der Expression demonstriert werden (Farahi Far et al. 1994). Die Abbildungen 33a und 33b zeigen in einer repräsentativen durchflußzytometrische Analyse die Veränderungen des "steady state" der Protein-Tyrosinphosphorylierung in permeabilisierten HL-60 Zellen (5 d Induktion der Differenzierung mit DMSO) und nach Stimulation mit f-MLP für 5 min. Alleinige f-MLP-Stimulation (Histogramm 2 und Balken 2) führt nur zu einer relativ geringen Fluoreszenzzunahme gegenüber der Negativkontrolle (Histogramm und Balken 1 in Abb. 33a und 33b). Dagegen

verursacht die Inhibition von PTP-Aktivität durch Vorbehandlung der Zellen mit einem potenten, spezifischen Hemmstoff, Vanadiumhydroperoxid ("Pervanadat", 200 μM ;

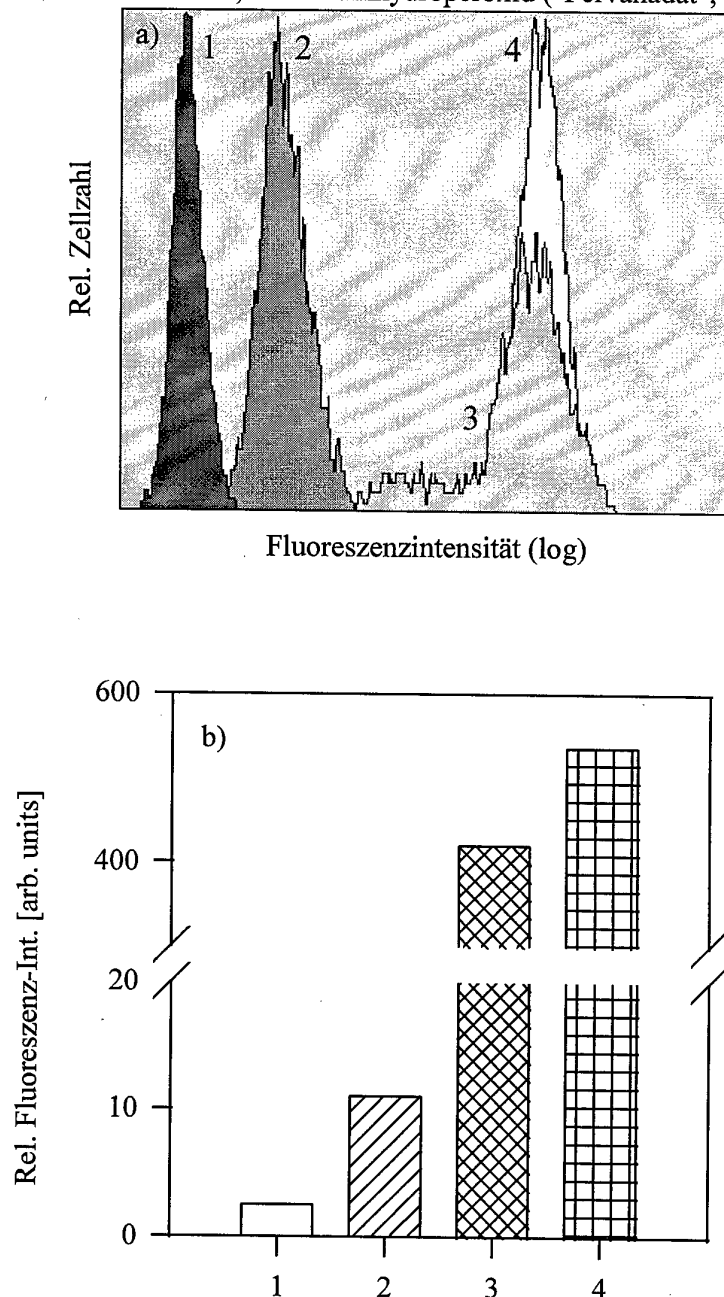


Abb. 33:

a) Konstitutive Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)- und -(Tyrosin)-Phosphatase (PTP)-Aktivitäten in HL-60 Zellen. Die Zellen wurden 5 d nach DMSO-Induktion mit oder ohne einem Inhibitor von Protein-Tyrosin-Phosphatase-aktivität, Vanadiumhydroperoxid (VanPer, 200 μM), im Ansatz mit oder ohne f-MLP 10 min stimuliert, permeabilisiert und mittels eines anti-Phosphotyrosin (αPY)-Antikörpers und Durchflußzytometrie der mittlere Phosphorylierungsgrad der Proteine aller Zellen bestimmt [(1) Negativkontrolle, (2) αPY , jeweils mit f-MLP, ohne VaPer; (3) und (4), jeweils mit VaPer, ohne und mit f-MLP]. b) Mittlere Fluoreszenzintensitäten (in rel. Einheiten) der Histogramme 1 - 4 aus Abb. a).

Swarup et al. 1982; Fantus et al. 1989; Grinstein et al. 1990; Trudel et al. 1991) für 10 min - ohne f-MLP - einen ausgeprägten Fluoreszenzanstieg (Abb. 33a, Histogramm 3 und Abb. 33b, Balken 3), der auch durch gleichzeitige Stimulation der Zellen mit f-MLP (Abb. 33a, Histogramm 4 und Abb. 33b, Balken 4) oder PMA (nicht gezeigt) nur noch leicht gesteigert werden kann. Abb. 33b faßt diese Daten als Mittelwerte der Fluoreszenzverteilungen zusammen.

Als potentielle Effektoren der Tyrosin-Phosphorylierungen an Proteinen konnten durch "Western blot"-Untersuchungen die stabile Expression von PTK aus der "*src*"-Familie, darunter die PTK *p55^{c-fgr}* unter einer Vielzahl von Stimulationsbedingungen, die nicht extra aufgeführt werden müssen, in differenzierten HL-60 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34).

Die Behandlung der Zellen mit dem Antibiotikum Herbimycin A (16 h, 1 µg/ml) führte in Übereinstimmung mit der beschriebenen Degradationswirkung der Substanz durch Bindung an reaktive SH-Gruppen der Proteine (Fukazawa et al. 1991; Uehara & Fukazawa 1991) zu einer starken Reduktion des nachweisbaren "*src*"-Proteins (Ergebnis nicht gezeigt). Die Phosphorylierungen an Tyrosinresten betreffen eine Reihe von Proteinen, die sich über einen weiten Molekulargewichtsbereich verteilen (Ergebnis nicht gezeigt).

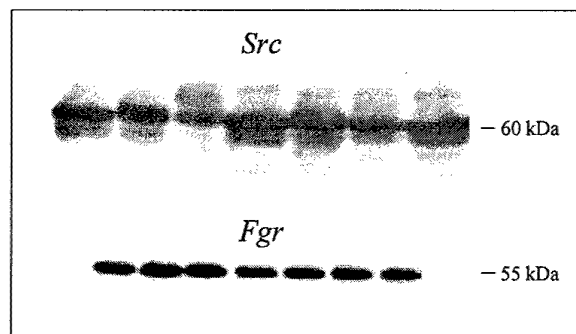


Abb. 34 : Expression von Proteintyrosin-Kinasen aus der "*src*"-Familie und der PTK *p55^{c-fgr}*. HL-60 Zellen, 4 d nach Induktion der Differenzierung, wurden lysiert, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran mittels spezifischen Antikörpern gegen "*src*" und "*fgr*" sowie "enhanced chemiluminescence" nachgewiesen.

3.2.5.1 Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität und "respiratory burst"

Ein etablierter Inhibitor von PTK ist neben dem Antibiotikum Herbimycin A das Flavon-Derivat Genistein, das im aktiven Zentrum der Enzyme mit ATP um die Substratbindungsstelle konkurriert (Akiyama et al. 1987; Uckun et al. 1993). Genistein zeigt eine

konzentrationsabhängige Inhibition der "burst"-Reaktion. Eine Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ bewirkt bei der durchflußzytometrischen Analyse eine Restaktivität des f-MLP-vermittelten "respiratory burst" von ca. 25% (Abb. 35). Die IC_{50} für Genistein liegt dabei bei ca. 10 $\mu\text{g/ml}$.

Die Luminol-abhängige, durch PMA oder Immunkomplexe stimulierte Chemolumineszenz reagiert empfindlicher auf Genistein. Bereits eine 5-minütige Vorinkubation der Granulozyten mit 25 $\mu\text{g/ml}$ führt jeweils zu einer Reduktion der Lichtausbeute um ca. 85% (Abb. 35) bei einer - gegenüber f-MLP-Stimulation - deutlich gesteigerten Empfindlichkeit mit einer IC_{50} zwischen 0,25 und 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Herbimycin A verursacht zwar erst bei Langzeitinkubation (>10 h) der Zellen eine PTK-Degradation, vermag aber bereits bei Kurzzeit-Applikation inhibitorisch auf PTK-Aktivität zu wirken. Die Restlichtausbeute der Granulozyten in der Chemolumineszenz nach nur 10-minütiger Vorinkubation der Zellen mit dem Inhibitor (1 $\mu\text{g/ml}$) und PMA-Stimulation beträgt ca. 25% (Abb. 35) mit einer IC_{50} für Herbimycin A von ca. 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Damit ist für jeden der drei Stimuli eine Beteiligung von PTK-Aktivität(en) bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion wahrscheinlich.

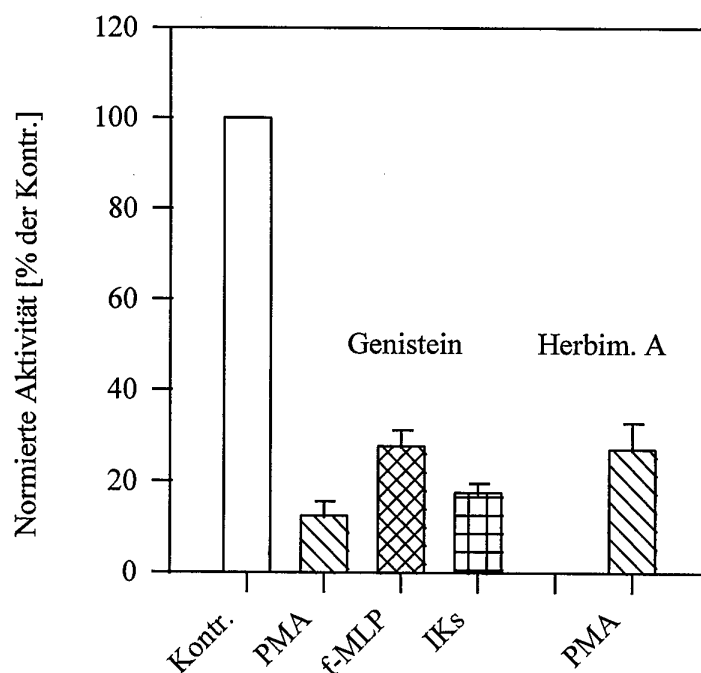


Abb. 35: Beteiligung von Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit Inhibitoren von PTK-Aktivität, Genistein (25 $\mu\text{g/ml}$) oder Herbimycin A (1 $\mu\text{g/ml}$), 5 bzw. 10 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen (IKs) durchflußzyto- oder lumino-metrisch (Herbim. A) bestimmt.

3.2.5.2 Protein-(Tyrosin)-Phosphatase-Aktivität und "respiratory burst"

In Analogie zum Einsatz von Vanadiumhydroperoxid als Stabilisator von Phosphotyrosinresten (siehe Kap. 3.2.4) kann eine Vanadiumverbindung auch bei der durchflußzytometrischen Analyse des "respiratory burst" Verwendung finden. Unter der Annahme, daß eine Dephosphorylierung von Proteinen mit einer Termination der Reaktion einhergeht, ist unter Vanadateinsatz mit einer verstärkten Immunantwort zu rechnen. Dabei muß bei Verwendung von DHR 123 als Indikator allerdings auf den stärkeren Inhibitor "Pervanadat" verzichtet werden, da dieser selbst als Oxidationsmittel wirkt, und es muß Ortho (*o*)-Vanadat zum Einsatz kommen. Eine sekundäre Reduktion von *o*-Vanadat zu Va-Hydroperoxid durch H_2O_2 der induzierten "respiratory burst"-Reaktion kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Trudel et al. 1991; Bourgoin & Grinstein 1992; Cui et al. 1994).

Abb. 36 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des *o*-Vanadat-Effektes auf die f-MLP-induzierte "respiratory burst"-Reaktion von Granulozyten. Es zeigt sich eine signifikante ($p < 0,05$) Steigerung der Aktivität über den gesamten Konzentrationsbereich, die bei ca. 25 μM *o*-Vanadat in ein Plateau mündet (Abb. 36). Diese Aktivitätszunahme beträgt ca. 40% gegenüber den Kontrollansätzen durch Vorinkubation der Zellen für 10 min mit 25 μM *o*-Vanadat, während PMA-stimulierter "burst" im gleichen Konzentrationsbereich zu ca. 30% in einem bisher unverstandenen Mechanismus (Lu et al. 1992) signifikant ($p < 0,01$) inhibiert wird (Abb. 36).

Als selbständiger Stimulus von Granulozyten vermag *o*-Vanadat im Konzentrationsbereich 5 - 200 μM nicht zu wirken (Ergebnisse nicht gezeigt; Trudel et al. 1991). Damit ist angedeutet, daß die alleinige Erhöhung von Phosphorylierungen an Proteintyrosinresten nicht zur Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase ausreicht (Steinbeck et al. 1991) und daß zur Auslösung der "burst"-Reaktion die externen (PTK)-Stimuli (mit der Freisetzung von Lipid-2nd-messenger"-Molekülen; s. Kap. 4.2) notwendig sind.

Exogene Katalase-Aktivität (200 $\mu g/ml$) reduziert die in etwa verdoppelte Fluoreszenzintensität beim Ausgangswert der Proben nach 10 μM Va-Hydroperoxidzusatz auf das Kontrollniveau und verdeutlicht damit die Mitwirkung von H_2O_2 bei der Oxidation des Indikators Dihydrorhodamin 123 (Ergebnis nicht gezeigt; siehe Kap. 4.2.1).

Da wie oben (Kap. 1.1.3) ausgeführt, im Zuge der Aktivierung der NADPH-Oxidase neben Phosphorylierungen an Tyrosinresten auch solche an Serinresten vorkommen (z.B. an p47^{phox}, El Benna et al. 1994; Bengis-Garber & Gruener 1995), die durch eine andere Gruppe von Protein-Phosphatasen (PP; Unterklassen: PP-1 und -2A) wieder entfernt werden (Cohen 1989; Lu et al. 1992), kam in weiteren Experimenten mit dem Polyäther-Derivat einer C₃₈-Fettsäure, "Okadaic acid" (OA; Cohen et al. 1990; Sasaki et al. 1993),

ein spezifischer Inhibitor für diese Enzymgruppe (Serin-Threonin-Protein Phosphatasen) zum Einsatz.

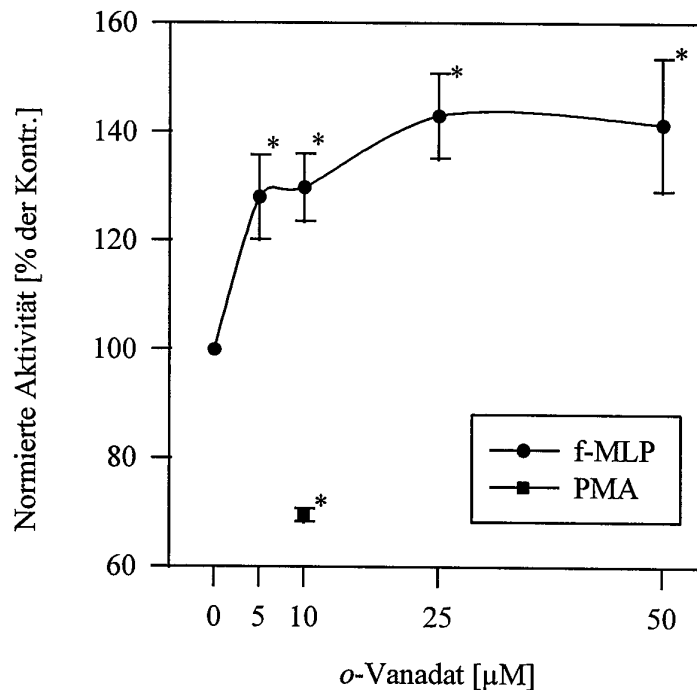


Abb. 36: Beteiligung von Protein-Phosphatase-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. 1. Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Konzentrationsabhängigkeit der Behandlung mit Ortho-Vanadat auf die f-MLP- oder PMA-vermittelte "respiratory burst"-Reaktion von Granulozyten. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor 10 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation durchflußzytometrisch gemessen.

Eine Vorbehandlung für 10 min von Granulozyten oder von HL-60 Zellen (nach 4 - 5 Tagen der Induktion zur Differenzierung) mit bis zu 2 µM OA verursacht - ähnlich den Beobachtungen nach o-Vanadat-Inkubation - stimulus-abhängige Reaktionen. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Inhibition der "burst"-Antwort nach PMA-Stimulation, die bei Granulozyten bei ca. 250 nM OA einsetzt und in Übereinstimmung mit Djerdjouri et al. (1995) mit einer IC_{50} von ca. 850 nM bei 2 µM zu einer kompletten Unterdrückung der Reaktion führt (Abb. 37). HL-60 Zellen reagieren noch empfindlicher (IC_{50} ca. 75 nM) und ihre "burst"-Funktion nach PMA-Stimulation wird bereits von 100 nM OA auf ca. 15% Restaktivität reduziert (Abb. 37). Die Immunkomplex-induzierte Reaktion der Granulozyten wird ebenfalls konzentrationsabhängig durch 2 µM OA völlig inhibiert (Abb. 37).

Dagegen verursacht OA-Vorbehandlung der Granulozyten bei der f-MLP-induzierten Reaktion mit CytB im Ansatz nur relativ geringe Anstiege (auf ca. 130% bei 1000 nM; $p > 0,05$) des "burst" der Kontrollen, während sich beim Ansatz ohne CytB im OA-

Konzentrationsbereich von 500 nM bis 1 μ M starke Zunahmen auf ca. 300% ($p < 0,05$) der Kontrollen ergeben (Abb. 37).

Mit diesen Ergebnissen ist auch die Beteiligung von Ser/Thr-Proteinphosphatasen an der Regulation der "respiratory burst"-Reaktion der Neutrophilen/HL-60 Zellen deutlich belegt.

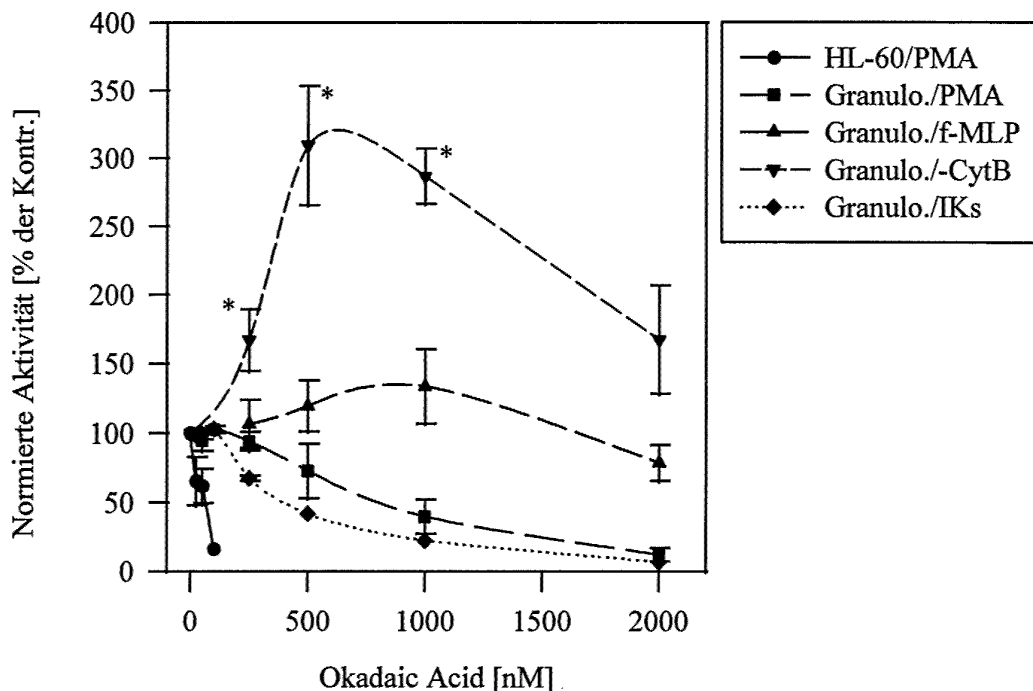


Abb. 37: Beteiligung von Protein-Phosphatase-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. 2. Protein-Serin/Threonin-Phosphatasen. Konzentrationsabhängigkeit der Behandlung mit "Okadaic acid" auf die f-MLP-, PMA- oder Immunkomplex (IKs)-vermittelte "respiratory burst"-Reaktion von Granulozyten oder HL-60 Zellen (4 -5 d DMSO). Die Zellen wurden mit dem Inhibitor 10 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation mit PMA, f-MLP ($\pm$ CytB) oder IKs luminometrisch bestimmt.

3.2.6 Phosphatidylinositol 3-Kinase-Aktivität und "respiratory burst"

Die Enzymaktivität der PtdIns 3-Kinase (PI3-K) phosphoryliert den Inositolrest von PtdIns-Verbindungen stereoselektiv an der 3'-Position. Als charakteristische Produkte entstehen dabei PtdIns-Mono-, Di- oder Triphosphate, PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ (Hawkins et al. 1992; Stephens et al. 1994). Eine mögliche Bedeutung dieser Phospholipide bei der Auslösung der "respiratory burst"-Aktivität in Neutrophilen wird erst seit kürzerer Zeit diskutiert (Stephens et al. 1991; Arcaro & Wymann 1993; Okada et al. 1994; Stephens et al. 1994, Thelen et al. 1994; Nakanishi et al. 1995).

Der Penicillium-Metabolit Wortmannin ist durch seine irreversible, kovalente Bindung an die katalytische p110-Untereinheit des Enzyms ein potenter und im nM-Konzentrationsbereich ein selektiver Inhibitor von PI3-K-Aktivität (Arcaro & Wymann 1993; Yano et al. 1993; Powis et al. 1994; Thelen et al. 1994). In der durchflußzytometrischen Analyse der "respiratory burst"-Aktivität von Granulozyten kann diese durch Vorinkubation der Zellen für 5 min konzentrationsabhängig reduziert und mit 100 nM Wortmannin nach f-MLP-Stimulation völlig inhibiert werden, während unter der gleichen Wortmannin-Konzentration die PMA-vermittelte oder durch Aktivierung der Zellen mit Immunkomplexen ausgelöste Reaktion eine Restaktivität von ca. 25% bzw. 30% aufweist (Abb. 38). Die IC_{50} -Konzentration liegt dabei für PMA- und f-MLP-Stimulation bei 6 - 7 nM Wortmannin (bei Immunkomplexen bei ca. 50 nM) und kann durch Verzicht auf CytB im Ansatz mit f-MLP auf < 1 nM gesenkt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der Luminol-abhängige Chemolumineszenz-Assay reagiert etwas resistenter auf eine Inhibitor-Vorbehandlung der Granulozyten mit Restaktivitäten nach 100 nM Wortmannin von 26% bzw. 64% nach f-MLP- bzw. PMA-Stimulation, jedoch empfindlicher auf Immunkomplex-Aktivierung mit ca. 10% Restaktivität (Abb. 38).

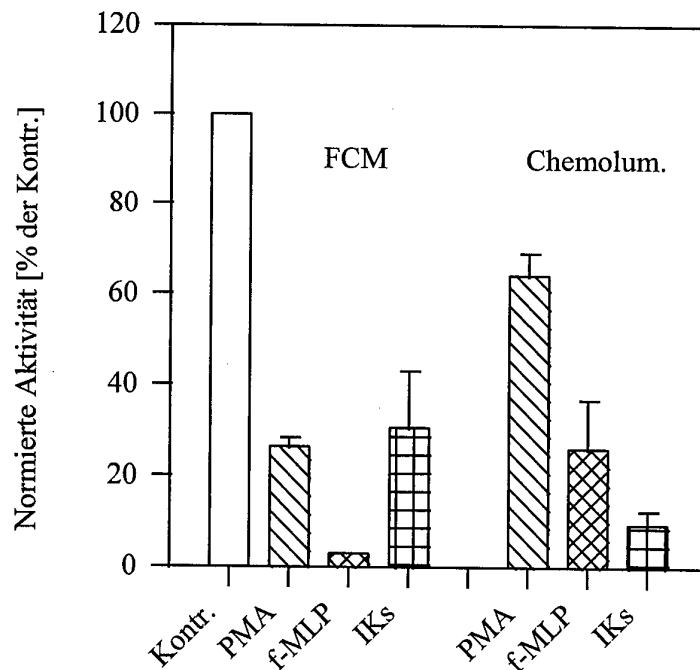


Abb. 38: Beteiligung von Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. 1) Effekt von Wortmannin. Granulozyten wurden mit dem Inhibitor von PI3-K-Aktivität, Wortmannin (100 nM), 5 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen (IKs) durchflußzyto ("FCM")- oder lumino-metrisch ("Chemolum.") bestimmt.

Im Gegensatz zu Wortmannin konkurriert ein kürzlich publizierter, weiterer Inhibitor der PI3-K, das Quercetin-Derivat mit der Kurzbezeichnung "LY294002", [chemischer Name: 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one], mit ATP um die Bindungsstelle am Enzym (Vlahos et al. 1994 und 1995; Nakanishi et al. 1995).

Im Chemolumineszenz-Assay (jeweils $n = 2$) zeigt LY294002 konzentrationsabhängige Effekte und verursacht nach Vorinkubation von Granulozyten mit $100 \mu\text{M}$ für 5 min eine starke Inhibition der "respiratory burst"-Aktivität auf ca. 12% Restaktivität nach f-MLP-Stimulation in Anwesenheit von CytB und auf 3,5% ohne CytB (Abb. 39). Die IC_{50} -Werte betragen in Übereinstimmung mit Vlahos et al. (1995) ca. $20 \mu\text{M}$ bzw. 1 - 2 μM . Dagegen ist die PMA-stimulierte Aktivität bis $50 \mu\text{M}$ LY294002 praktisch nicht beeinflusst und fällt erst bei $100 \mu\text{M}$ leicht auf ca. 85% ab (Abb. 39). Der Immunkomplex-stimulierte "burst" der Granulozyten zeigt eine mittlere Empfindlichkeit mit einer Restaktivität nach $100 \mu\text{M}$ LY294002 von ca. 40% ($n = 2$).

Im Gegensatz zur Chemolumineszenz reagiert der durchflußzytometrische "respiratory burst"-Assay (jeweils $n = 2 - 3$) nach PMA-Stimulation empfindlicher auf eine Vorbehandlung der Granulozyten mit LY294002. Dies betrifft sowohl den Ausgangswert der

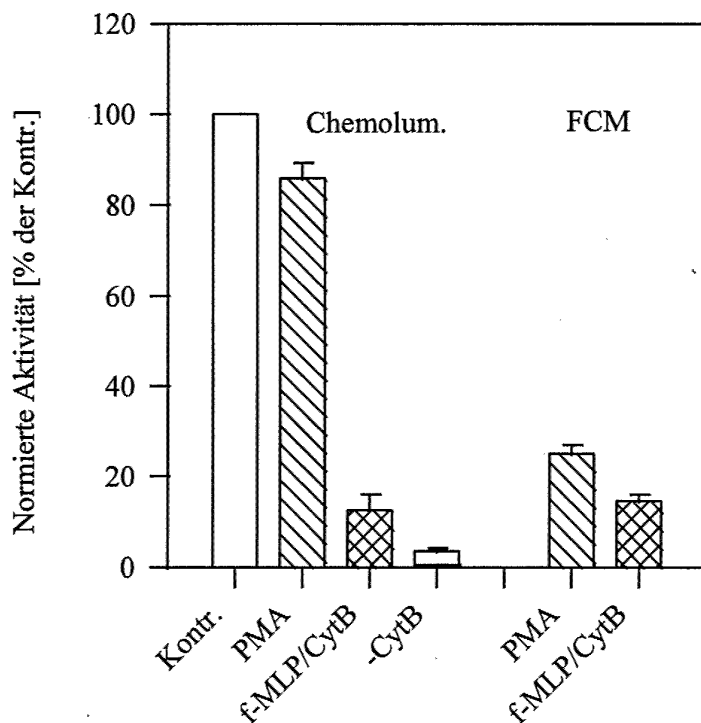


Abb. 39:

Beteiligung von PtdIns 3-Kinase (PI3-K)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. 2) Effekt von LY294002. Granulozyten wurden mit einem Inhibitor von PI3-K-Aktivität, LY294002 ($100 \mu\text{M}$), 5 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit PMA oder f-MLP ($\pm$ CytB) durchflußzyto ("FCM")- oder luminometrisch ("Chemolum.") bestimmt.

Fluoreszenzintensität vor Stimuluszugabe ($T = 0'$) und die scheinstimulierten Ansätze (Ergebnisse nicht gezeigt) als auch die stimulierte Fluoreszenz der Zellen ($T = 15'$). Die Restaktivität nach 100 μM LY294002 beträgt hier ca. 25% (IC_{50} : ca. 15 μM), während die f-MLP-vermittelte "burst"-Aktivität mit einer Inhibition von 85% vergleichbar mit der der Chemolumineszenz ist (Abb. 39).

Damit ist auch eine Mitwirkung von PI3-K-Aktivität bei der Stimulation der "respiratory burst"-Oxidase durch PMA, f-MLP oder Immunkomplexe sehr wahrscheinlich.

Für HL-60 Zellen unter DMSO-Induktion und f-MLP-Stimulation (+ CytB) läßt sich eine allmähliche Angleichung ihrer Empfindlichkeit (im Zeitraum 3 bis 6 d nach Induktion der Differenzierung) gegenüber LY294002 an die reifer Granulozyten beobachten, was als möglicher neuer Differenzierungsmarker für HL-60 Zellen zu werten ist (Abb. 40). Die Resistenz der HL-60 Zellen gegenüber 100 μM LY294002 nach PMA-Stimulation ist mit 85-90% Restaktivität vergleichbar der von Granulozyten (Ergebnisse nicht gezeigt).

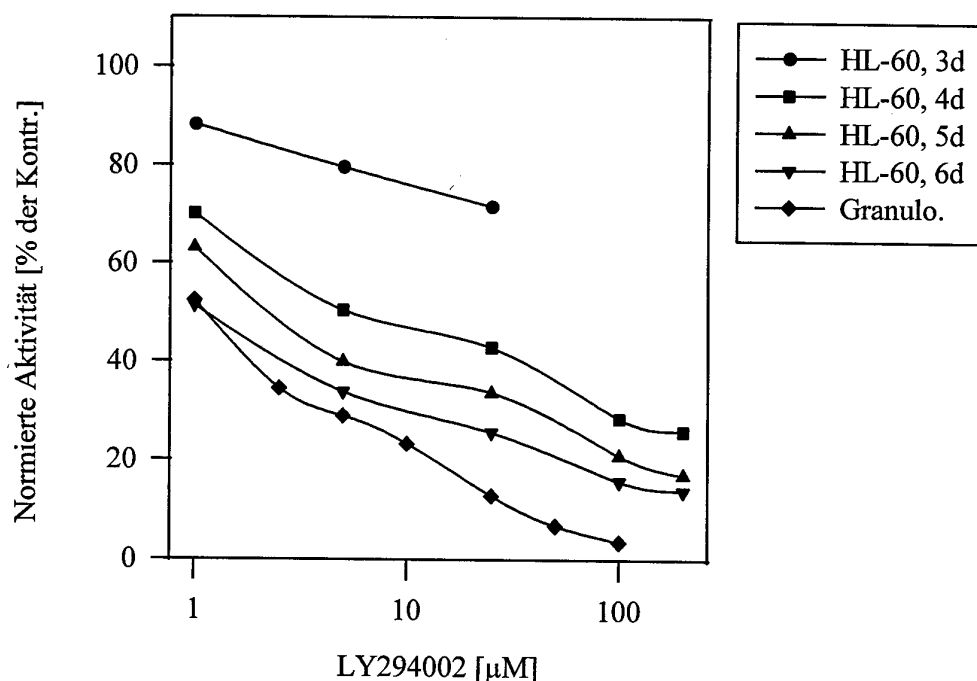


Abb. 40: Angleichung der Empfindlichkeit von HL-60 Zellen gegenüber einem Inhibitor von PI3-K-Aktivität, LY294002, im Laufe ihrer Differenzierung an die reifer Granulozyten. HL-60 Zellen unter DMSO-Behandlung wurden zwischen den Tagen 3 und 6 nach Induktion der Differenzierung mit LY294002 vorbehandelt und ihre Reaktion auf eine f-MLP-Stimulation luminometrisch im Vergleich zu Granulozyten (Mittelwert; $n = 3$) bestimmt.

Ein Strahleneffekt auf PI3-K-Aktivität zeigt sich am deutlichsten in Verbindung mit der Inhibition der Kinase durch niedrige Konzentrationen (1 bis 50 nM) von Wortmannin und

Stimulation beider bestrahlter Zelltypen mit dem Formylpeptid. Dies betrifft sowohl die chemoluminometrische als auch die durchflußzytometrische Analyse der Wortmannin-inhibierten "respiratory burst"-Reaktion, mit ausgeprägteren Effekten bei der letzteren. Abb. 41 zeigt für beide Verfahren nebeneinander die Abhängigkeit der Effekte von der Wortmannin-Konzentration nach Bestrahlung von Granulozyten mit 5 Gy. Während sich in der Luminometrie ab einer Konzentration von 5 nM Wortmannin ein Plateau bei ca. 85% des Kontrollwertes der unbestrahlten Zellen ($p: 0,012$) ausbildet ($n = 4$), fällt bei der DHR 123-Methode und 10 nM Wortmannin der Wert noch deutlich bis auf ca. 60% ab ($n = 6$; $p: < 0,01$). In Parallelansätzen erwies sich die Reaktivität bestrahlter und PMA-stimulierter Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich des Wortmannins als nicht signifikant verschieden von der der Kontrollzellen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine Untersuchung bei bestrahlten (5 Gy) Granulozyten mit LY294002 als PI3-K-Antagonist bestätigte ebenfalls die Stimulusabhängigkeit des Effektes (Abfall auf ca. 87% nach 5 μM LY294002 und f-MLP-Stimulation bei gleichzeitiger Stabilität nach PMA-Stimulation in der Chemoluminometrie; Ergebnisse nicht gezeigt).

Basierend auf diesen Ergebnissen kann somit auch eine Strahlenempfindlichkeit der Formylpeptid-aktivierten PI3-K-Aktivität in Granulozyten postuliert werden.

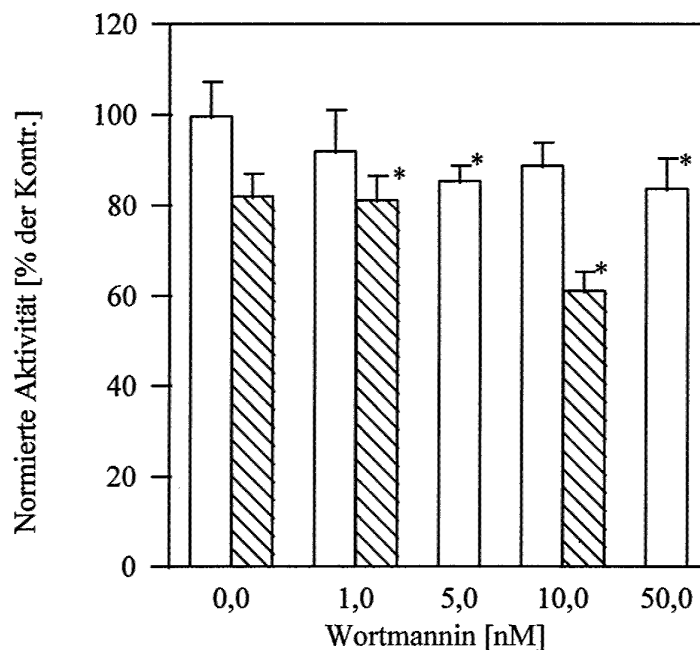


Abb. 41: Strahleneffekte auf PI3-K-Aktivität. Isolierte Granulozyten wurden mit 5 Gy bestrahlt, mit Wortmannin (1 - 50 nM) 5 min vorinkubiert und nach f-MLP (+ CytB)-Stimulation im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen mittels Chemolumineszenz oder Durchflußzytometrie (schraffierte Balken; ohne Meßwerte bei 5 nM und 50 nM Wortmannin) analysiert.

3.2.7 PTK- neben PI3-Kinase-Aktivität und "respiratory burst"

Nachdem - wie in den vorherigen Kapiteln 3.2.5.1 und 3.2.6 ausgeführt - deutlich geworden war, daß die "respiratory burst"-Reaktion sowohl auf Inhibition von PTK- als auch von PI3-K-Aktivität anspricht, und die Möglichkeit bestand (Brugge 1993), daß es sich hierbei um alternative Signaltransduktionswege handelt, wurde versucht, durch Kombinationen von PTK- und PI3-K-Inhibitoren zur Aufklärung dieser Wege beizutragen. Dabei kamen Inhibitor-Konzentrationen zum Einsatz, die nicht maximal inhibierend wirken: 0,5 µg/ml oder 5,0 µg/ml Genistein und 10 nM oder 50 nM Wortmannin.

Abb. 42 zeigt, daß nach PMA-Stimulation und luminometrischer Analyse von Granulozyten nach vorausgegangener PTK-(Teil)-Blockade durch Genistein dieser Effekt durch nachfolgende PI3-K-Inhibition durch Wortmannin teilweise wieder aufgehoben werden kann. Die Wirkung ist umso größer, je niedriger das Ausgangsniveau (bei hoher Genistein-Konzentration) ist und beträgt bei 5 µg/ml ca. 55% und bei 0,5 µg/ml ca. 19% Abschwächung auf erhöhte Restaktivitäten von 38% bzw. 60% (n = 3- 4; Abb. 42). Umgekehrt wird bei durchflußzytometrischer Untersuchung von Granulozyten mit PMA-Stimulus eine starke Inhibition (-70%) des "respiratory burst" durch 50 nM Wortmannin mittels 5 µg/ml Genistein komplett aufgehoben und auf das Niveau der alleinigen Genistein-Wirkung (-20%) zurückgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Im Gegensatz zur Stimulation mit PMA wird nach f-MLP-Aktivierung von Granulozyten (n = 2) eine etwa gleichstarke Hemmung der Reaktion (ca. -40 bis 50%) durch entsprechende Konzentrationen an Genistein (12,5 bzw. 25 µg/ml) oder Wortmannin (10 nM) durch die kombinierte Applikation beider Inhibitoren bei durchflußzytometrischer Analyse verstärkt auf eine 76%- bzw. 95%-ige Hemmung (Abb. 42).

Diese Ergebnisse deuten an, daß nach f-MLP-Stimulation auf dem Niveau von PTK- und PI3-K-Aktivitäten vermutlich Signaltransduktionswege aktiviert werden, die unabhängig voneinander parallel verlaufen, während nach PMA-Stimulation der Zellen Wege beschränkt werden, die eine wechselseitige positive Rückkopplung besitzen.

Experimente zur Strahlenempfindlichkeit dieser Elemente der Signaltransduktion zeigen unterschiedliche Effekte. Während unter 50 nM Wortmannin und 0,5 bis 5 µg/ml Genistein, einzeln oder in Kombinationen, keine zusätzliche Strahlenwirkung (5 Gy) auf die PMA-stimulierte "respiratory burst"-Reaktion von Granulozyten gefunden wird, zeigt sich in der Kombination von 50 nM Wortmannin mit Herbimycin A (500 ng/ml) ein weiterer deutlicher Hemmeffekt auf ca. 80% der Aktivität unbestrahlter Kontrollzellen, jedoch ebenfalls keine Wirkung bei Einzelapplikation der Antagonisten (Ergebnisse nicht gezeigt).

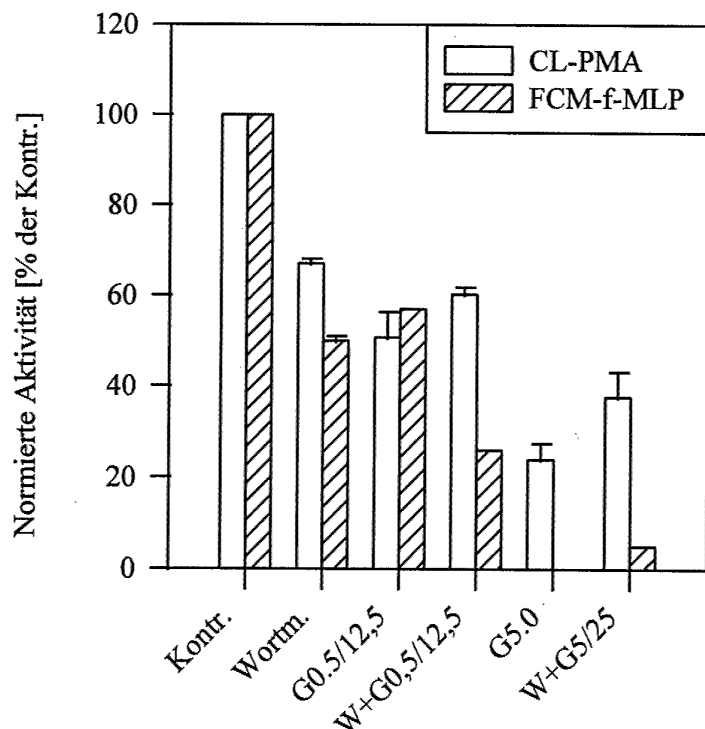
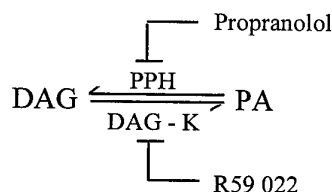


Abb. 42: Simultane Beteiligung von PTK- und PI3-K-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit Genistein ["G"; 0,5 oder 5 $\mu\text{g/ml}$ (PMA) bzw. 12,5 oder 25 $\mu\text{g/ml}$ (f-MLP)] 15 min und/oder mit Wortmannin ["W"; 50 nM (PMA) oder 10 nM (f-MLP)] 5 min vorbehandelt und nach PMA-Stimulation luminometrisch (CL), nach f-MLP-Stimulation durchflußzytometrisch (FCM) analysiert.

3.2.8 Diacylglycerin-Kinase-/Phosphatidyl-Phosphohydrolase-Aktivitäten und "respiratory burst"

In einem vorausgegangenen Abschnitt (Kap. 3.2.3.1) waren bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion beteiligte Enzymaktivitäten besprochen worden, zu deren Produkten Diacylglycerol (DAG) als der physiologische (Ko)Aktivator von klassischer PKC-Aktivität zählt (siehe Kap. 1.1.4). DAG wird durch die beiden Enzyme Diacylglycerin-Kinase (DAG-K) und Phosphatidyl-Phosphohydrolase (PPH) metabolisiert (Garland 1992; Cohen 1994). Sie sind Gegenspieler bei der Phosphorylierung von DAG zu Phosphatidsäure (PA) durch DAG-K-Aktivität bzw. bei der Dephosphorylierung von PA zu DAG durch PPH-Aktivität gemäß folgendem Schema:



Modulation dieser Enzymaktivitäten sollte sich bei der erwarteten Bedeutung von DAG-aktivierter PKC für den "respiratory burst" von Phagozyten deshalb bei dessen Bestimmung bemerkbar machen.

Der β -Rezeptorenblocker Propranolol ist auf zellulärem Niveau ein etablierter Antagonist von PPH-Aktivität (Pappu & Hauser 1983; Billah et al. 1989; Rossi et al. 1990; Gay & Murray 1991). Sowohl im HL-60 Modell (5 d DMSO) als auch bei peripheren Granulozyten führt eine Vorbehandlung der Zellen für 10 min mit Propranolol konzentrationsabhängig zu einem biphasischen Reaktionsmuster: Zunächst erfolgt eine Stimulation, die in eine Hemmung der f-MLP-vermittelten "respiratory burst"-Reaktion übergeht, während die PMA-stimulierte Reaktion in jeder getesteten Konzentration inhibiert wird. Dabei kommt der Vorinkubation der Zellen mit CytB bei f-MLP-Stimulation eine reaktionsmodulierende Wirkung zu; ohne CytB-Einschluß im Ansatz ist der stimulierende Effekt von Propranolol sehr viel ausgeprägter (English & Taylor 1991). Spenderabhängig wird bei Granulozyten eine nahezu Verzehnfachung der "burst"-Antwort auf f-MLP ohne CytB durch 50 μ M Propranolol beobachtet; der durchschnittliche Stimulationsfaktor beträgt das ca. 8-fache der Kontrolle ohne Propranolol (Abb. 43). Mit CytB im f-MLP-Ansatz liegt der maximale Propranolol-Effekt bei 25 μ M bei einer durchschnittlich um den Faktor 1,4 erhöhten Stimulation ($p < 0,05$; Abb. 43). Inkubation der Zellen mit 100 μ M Propranolol führt bei f-MLP-Stimulation ($\pm$ CytB) zu einer vollständigen Hemmung mit IC_{50} -Werten von 70 μ M (+ CytB) bzw. 95 μ M (- CytB); für PMA-Stimulation beträgt der IC_{50} -Wert ca. 100 μ M mit einer ca. 8%igen Inhibition bei 50 μ M Propranolol (Abb. 43). Da unter f-MLP-Stimulation die Vitalität der Zellen bei 100 μ M Propranolol gegenüber den Kontrollen nur um ca. 5 - 10% erniedrigt ist (Ergebnisse nicht gezeigt), muß hier ein weiterer Effekt des PPH-Antagonisten auf die Zellen vorliegen (siehe Kap. 4.2.3.1.5).

Grundsätzlich ähnliche, jedoch weniger stark ausgeprägte Auswirkungen einer Propranolol-Vorbehandlung werden bei HL-60 Zellen gefunden, mit einem Verstärkungsfaktor bis ca. 1,5 bei 50 μ M nach f-MLP-Stimulation mit CytB (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind jedoch auf Grund der geringen Reaktion der Zellen (5 bis 6 d nach DMSO-Induktion) auf f-MLP weniger einheitlich. In beiden Zelltypen beeinflusst CytB im Ansatz mit PMA die Reaktion. Granulozyten werden nur früh (15 min-Stimulationswert) inhibiert (auf ca. 55% der Kontrolle ohne CytB) und erreichen nach 30 min nahezu das

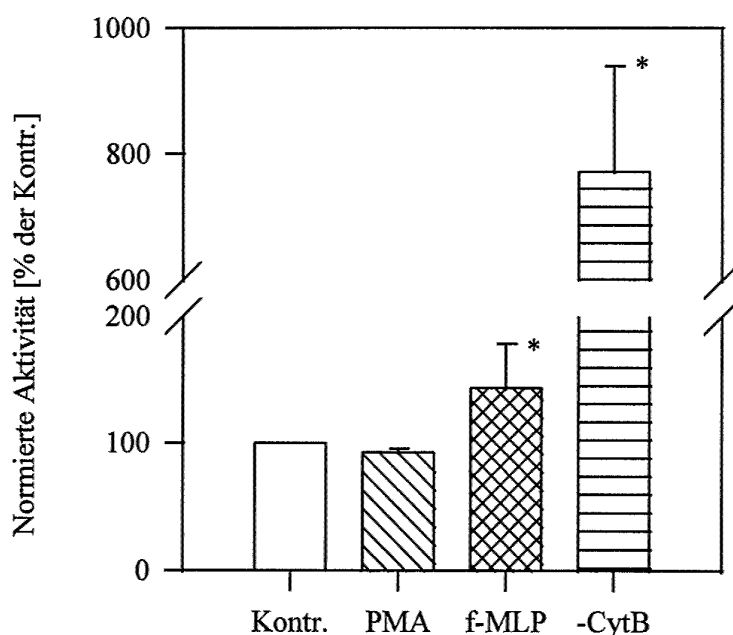


Abb. 43: Beteiligung von Phosphatidyl-Phosphohydrolase (PPH)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten wurden mit einem Inhibitor von PPH-Aktivität, Propranolol (50 μ M), 10 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen mit f-MLP ($\pm$ CytB) oder PMA durchflußzytometrisch bestimmt.

Kontrollniveau (ca. 90%), während bei HL-60 Zellen sich die inhibierende Wirkung von CytB kontinuierlich verstärkt (Restaktivität: 35% bzw. 10% nach 30 min bzw. 60 min Stimulation; Ergebnisse nicht gezeigt). Dieser inhibitorische Effekt von CytB bei PMA-Stimulation kann durch Propranolol im Konzentrationsbereich 25 bis 200 μ M teilweise (bis 160% der Kontrolle ohne Propranolol) wieder aufgehoben werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der DAG-K-Inhibitor I mit der Kurzbezeichnung "R59 022" (chemischer Name: 6-[2-[4-[(4-fluorophenyl)phenylmethylene]-1-piperidinyl]ethyl]-7-methyl-5H-thiazol [3,2 α]-pyrimidin-5-one; de Chaffoy de Courcelles et al. 1985; Ohtsuka et al. 1990; Goin et al. 1993) kann bis zu einer Konzentration von 10 μ M ohne Einbußen an Vitalität der Zellen eingesetzt werden (bei 25 μ M zeigen sich besonders nach PMA-Stimulation deutliche Vitalitätsverluste; Ergebnisse nicht gezeigt). Hinsichtlich ihrer Reaktion auf R59 022 erweisen sich Granulozyten und HL-60 Zellen (5 - 6 d nach Induktion zur Differenzierung) als verschieden bei nachfolgender PMA-Stimulation, jedoch gleich nach f-MLP-Stimulation. Vorinkubation der Zellen mit dem Antagonisten (10 μ M) für 5 min verursacht bei nachfolgender Stimulation mit f-MLP in beiden Zelltypen 15 min bzw. 30 min nach Stimulation mit ca. 50% ($p < 0,01$) bzw. 25% ($p < 0,01$) signifikant höhere Reaktionen, jedoch keinerlei zusätzliche Aktivität nach PMA-Stimulation der Granulozyten (Abb. 44).

Hingegen verdreifacht sich die durchschnittliche Reaktion der HL-60 Zellen auf PMA 30 min nach Stimulation ($p < 0,01$; Abb. 44).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der Metabolisierung von DAG für die Stimulierbarkeit der "respiratory burst"-Aktivität der Granulozyten/HL-60 Zellen.

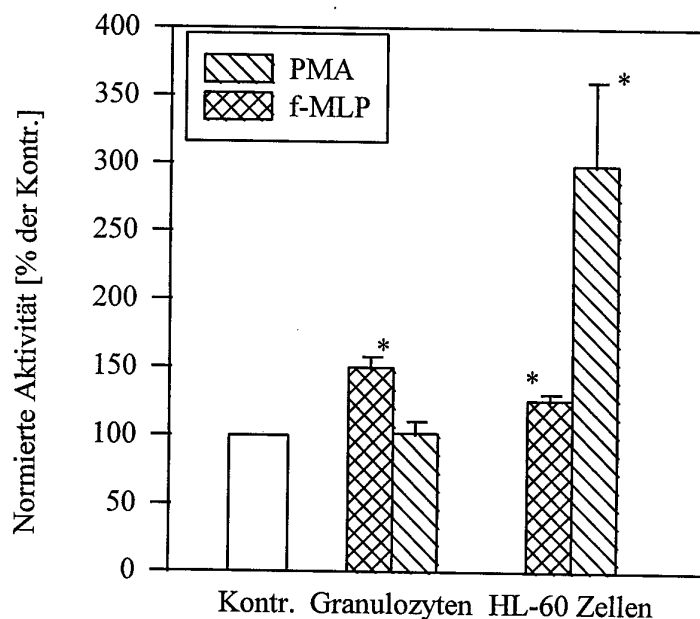


Abb. 44: Beteiligung von Diacylglycerin-Kinase (DAG-K)-Aktivität bei der "respiratory burst"-Reaktion. Granulozyten und HL-60 Zellen (5-6 d nach Induktion zur Differenzierung) wurden mit einem Inhibitor von DAG-K-Aktivität, R59 022 (10 μ M), 5 min vorinkubiert und die Reaktion nach Stimulation der Zellen für 15 min (Granulozyten) bzw. 30 min (HL-60 Zellen) mit f-MLP oder PMA durchflußzytometrisch bestimmt.

Auch auf die Aktivität von DAG-Kinase ist im HL-60-Modell eine Strahlenwirkung darstellbar. Abb. 45 zeigt den Effekt einer Bestrahlung mit 2 Gy am Tag 0 auf die Untersuchungen 5 bis 6 d nach Induktion der Differenzierung. Alleinige Bestrahlung verursacht in der durchflußzytometrischen Analyse - ähnlich der Situation bei den akut bestrahlten Granulozyten (s.o.) - eine Erhöhung der $T = 0$ min-Werte um ca. 30% gegenüber den Kontrollen ($p < 0,05$; Abb. 45). Im Laufe der PMA-Aktivierung fällt die Stimulierbarkeit der bestrahlten Zellen kontinuierlich auf ca. 60% der Kontrollwerte nach 40 min ab ($p < 0,05$) und erholt sich bis zum Ende der Stimulationszeit (60 min) wieder auf das Kontrollniveau (Abb. 45).

Nach Inkubation mit dem DAG-K-Antagonisten R59 022 (5 min; 10 oder 25 μ M; $n = 4$) und Stimulation der Zellen mit PMA ist die Reaktivität der bestrahlten Zellen initial unverändert (ca. 105% der unbestrahlten Kontrollzellen), durchläuft ein statistisch signifikantes Minimum nach einer Stimulationszeit von 30 min bei ca. 50% ($p < 0,01$) und liegt gegenüber dem Ansatz ohne DAG-K-Inhibitor beschleunigt - nach 40 bis 50 min wieder im

Bereich der Kontrollen (Abb. 45). Die Unterschiede zwischen den beiden Kurvenverläufen ohne und mit R59 022 sind für die Zeitpunkte 10 min und 40 min nach Stimulation signifikant verschieden ($p < 0,05$ bzw. $< 0,01$; #).

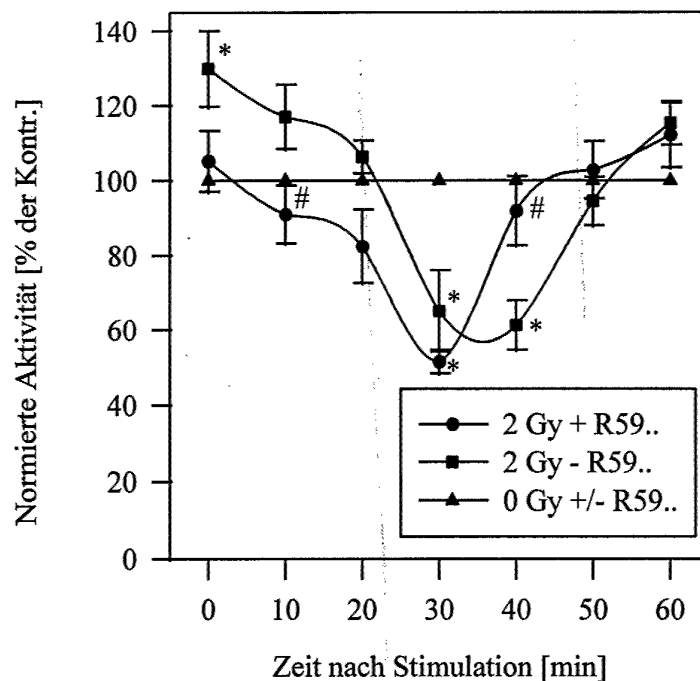


Abb. 45: Strahleneffekt auf DAG-Kinase-Aktivität. HL-60 Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy am Tag 0 und 5 bis 6 d nach DMSO-Behandlung wurden mit R59 022 (10 oder 25 μ M) 5 min vorbehandelt und nach PMA-Stimulation die "respiratory burst"-Reaktion durchflußzytometrisch bestimmt (Reaktionen unbestrahlter Kontrollzellen = 100%).

3.3 Strahleneffekte auf Lipidmetabolite als "2nd messenger" der Signaltransduktion

In den vorausgegangenen Kapiteln ist gezeigt worden, daß zelluläre/enzymatische Elemente in Signaltransduktionswegen zur Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase in Granulozyten und HL-60 Zellen grundsätzlich auf ionisierende Bestrahlung empfindlich reagieren können. Da sich darunter zwei Enzyme (DAG-K und PI3-K) befinden, deren Aktivität direkt oder indirekt den zellulären Gehalt an DAG (mit)bestimmen können, war es von Interesse auch den DAG-Gehalt bestrahlter Zellen mit und ohne zusätzlichem Stimulus zu untersuchen.

Die bisherigen Experimente verwenden nur f-MLP als stimulierendes Agens bei HL-60 Zellen nach 4 bis 5 Tagen der DMSO-induzierten Differenzierung, die im Gegensatz zu

den zuvor (Kap. 3.2) beschriebenen HL-60-Experimenten im Minuten- bis Stundenbereich vorher bestrahlt worden waren.

In Vorversuchen zeigte sich dabei, daß nicht nur der DAG-Gehalt von Zellen, sondern auch die verwandte Lipidklasse der Alkylacylglyceride (AAG) auf Bestrahlung reagiert. AAGs sind durch das Vorhandensein einer Fettsäure, die über eine Ätherbindung an die C₁-Position des Glycerols gebunden ist, gekennzeichnet. Beide Lipidfamilien sind im angewandten Extraktions- und Nachweisverfahren mit HPLC nebeneinander nachweisbar. Abb. 46 zeigt ein typisches Lipidspektrum der HPLC-Analyse unbestrahlter HL-60 Zellen (4 d nach DMSO-Zugabe) mit den für die angewandten Laufbedingungen typischen Retentionszeiten von ca. 9 bis 12 min der AAGs und von ca. 20 bis 25 min der DAGs sowie von ca. 28 bis 35 min für Monoglyceride. Die Identifikation der Lipidklassen erfolgte anhand der Retentionszeiten von Standardsubstanzen.

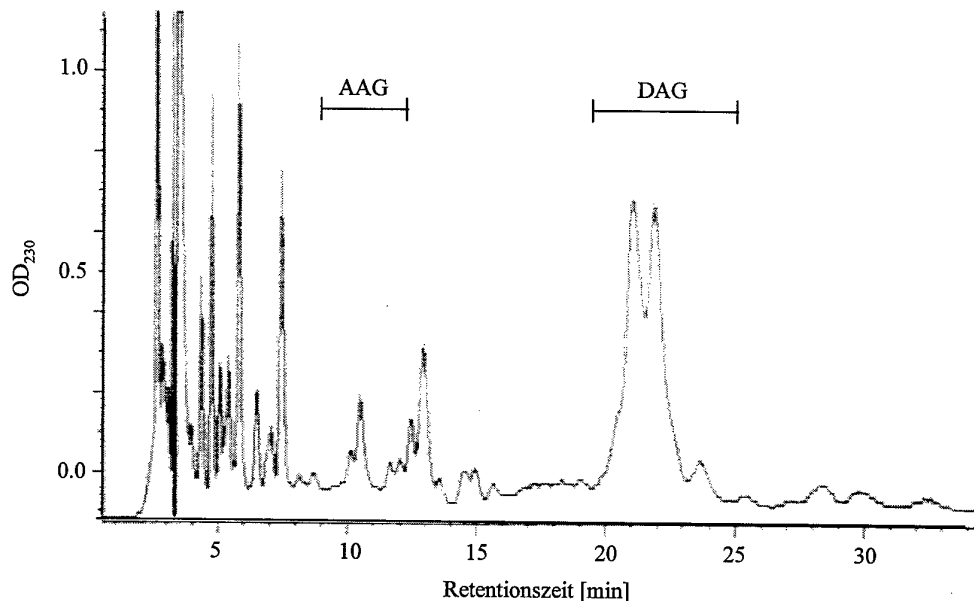


Abb. 46: Lipidanalyse von HL-60 Zellen mittels HPLC. Lipide aus HL-60 Zellen (4 d nach DMSO-Zugabe) wurden mit Hilfe von Chloroform und Methanol extrahiert, derivatisiert [mit Benzoessäureanhydrid und 4-(Dimethylamino)-Pyridin] und nach Aufnahme in Hexan einer HPLC-Analyse mit UV-Detektion (230 nm) unterzogen.

Die Auswertung der HPLC-Spektren erfolgte durch Integration über die zuvor festgelegten Bereiche der Lipidgruppen. Aus induzierten, aber unstimulierten HL-60 Zellen werden typischerweise DAG-Anteile an der Gesamtheit extrahierbarer Lipide von 5% - 7% bestimmt und AAG-Anteile von 2% - 3%, im konkreten Beispiel der Probe aus Abb. 46: 7,0% DAG bzw. 2,4% AAG. Veränderungen der AAGs werden nachfolgend nicht weiter ausgeführt.

Ein typisches Beispiel für Strahleneffekte auf den DAG-Gehalt unstimulierter HL-60 Zellen (4 - 5 d nach Induktion der Differenzierung) ist in Abb. 47 dargestellt. Es zeigt, daß alleine die experimentelle Manipulation der Zellen im Zusammenhang mit der Bestrahlung/Scheinbestrahlung im Zeitraum bis ca. 10 min nach Bestrahlung/Scheinbestrahlung zu einer leichten Zunahme um ca. 30% (1,5%-Punkte; ca. 5% → 6,5%) führt, die nach 30 und 60 min wieder auf den Ausgangswert zurückkehrt (Abb. 47). Nach Bestrahlung der Zellen mit Dosen bis zu 5 Gy zeigen sich dosisabhängige Veränderungen der DAG-Gehalte. Eine Dosis von 2 Gy nivelliert bereits den Effekt der experimentellen Manipulationen auf den DAG-Gehalt der Zellen über einen Zeitraum von 60 min nach Bestrahlung; Dosen von 4 Gy bzw. 5 Gy verursachen deutliche Abnahmen der DAG-Gehalte auf ca. 50% des Ausgangswertes 10 min bzw. 30 min nach Exposition (Abb. 47). 60 min nach Bestrahlungsende befinden sich alle Werte wieder im Ausgangsbereich (Abb. 47).

Damit ist gezeigt, daß Bestrahlung alleine temporär eindeutig meßbare Auswirkungen auf die Lipidzusammensetzung auf dem Niveau der DAGs von HL-60 Zellen hat.

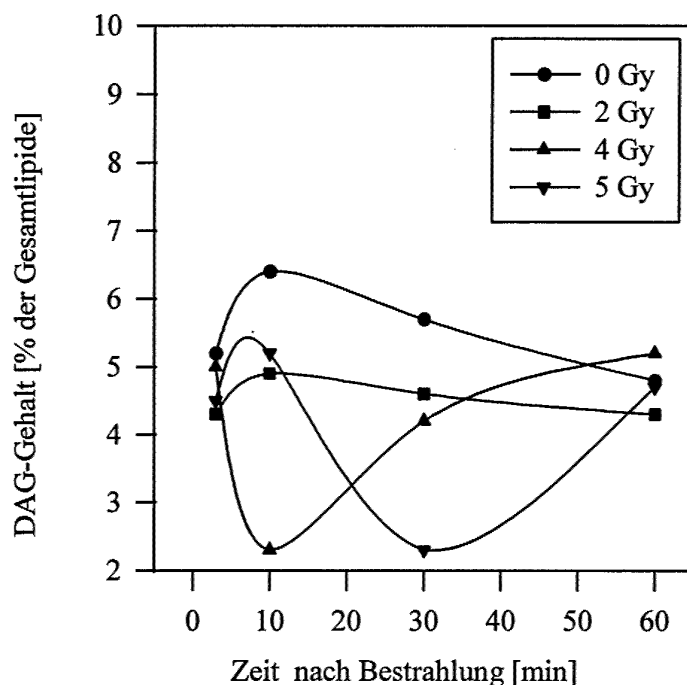


Abb. 47: Strahleneffekte auf den DAG-Gehalt von HL-60 Zellen. HL-60 Zellen (4 d nach DMSO-Induktion) wurden bestrahlt (2 - 5 Gy) und zu den angegebenen Zeitpunkten die DAG-Gehalte mittels HPLC bestimmt.

In den nachfolgenden Experimenten wurden die Effekte einer f-MLP-Stimulation auf die DAG-Gehalte bestrahlter Zellen im Zeitraum bis 20 min nach Bestrahlung analysiert. Zur Vermeidung einer weiteren Variablen im Ansatz wurden diese Versuche ohne CytB vorge-

nommen, da Vorversuche eigenständige Effekte einer alleinigen CytB-Behandlung auf die Lipidzusammensetzung der Zellen ergeben hatten (Ergebnisse nicht gezeigt).

In weiteren Vorversuchen war auch der Zeitpunkt der stärksten Veränderungen nach f-MLP-Stimulation mit 2 min bestimmt worden (Ergebnisse nicht gezeigt), die in den nachfolgenden Experimenten konstant gehalten wurde. F-MLP-Stimulation unbestrahlter Zellen (5 d nach DMSO-Behandlung) führt 1 min nach Scheinbestrahlung zu einem Anstieg des DAG-Gehaltes um ca. 30% (2%-Punkte; ca. 7% → ca. 9%), der zu den Zeiten 3, 7 und 20 min nicht mehr induziert werden kann und mit abnehmender Tendenz zu DAG-Gehalten unterhalb des Ausgangswertes führt (ca. -30% nach 20 min; Abb. 48). Einen prinzipiell ähnlichen Verlauf nimmt der DAG-Gehalt stimulierter Zellen nach 1 Gy, jedoch ohne die ausgeprägte Zunahme nach 1 min (Abb. 48). Dosen von 2 Gy und 5 Gy (nicht gezeigt) führen zu DAG-Gehalten unterhalb des Ausgangswertes zu allen Meßzeitpunkten mit einem Minimum bei ca. 50% der Kontrolle zum Zeitpunkt 3 min nach Bestrahlung (Abb. 48).

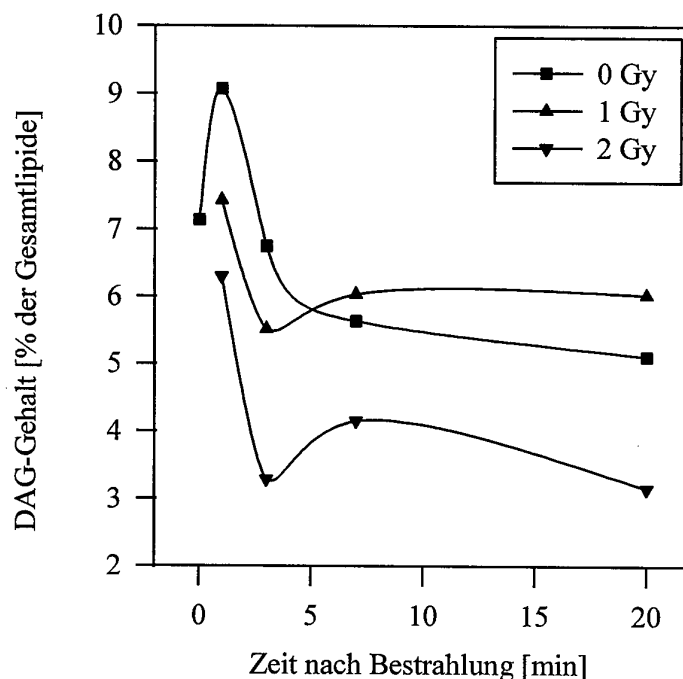


Abb. 48: Strahleneffekte auf den DAG-Gehalt f-MLP-stimulierter HL-60 Zellen. HL-60 Zellen (5 d nach DMSO-Induktion) wurden bestrahlt (1 - 2 Gy) und die DAG-Gehalte nach Stimulation mit f-MLP (2 min) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mittels HPLC bestimmt.

Mit diesen Daten ist auch ein antagonisierender Strahleneffekt auf die durch f-MLP provozierte Freisetzung von DAGs aufgezeigt.

4. Diskussion

Während die klassische Lehrmeinung in der Strahlenbiologie bis in die späten 80er Jahre hinein davon ausging, daß der Intermediärstoffwechsel äußerst strahlenresistent sei, hat die moderne strahlenbiologische Forschung seit dieser Zeit zunehmend Hinweise dafür erbracht, daß die DNA des Zellkerns nicht alleine als *das* Target für ionisierende Strahlen betrachtet werden darf. Vielmehr muß über die Effekte an der DNA hinaus, die Strahlenwirkung auf weitere zelluläre Elemente mit weitreichenden Konsequenzen für die bestrahlte Zelle, das Organ und den Gesamtorganismus in Betracht gezogen werden (Review: Coleman 1993). Ohne Kenntnis ihres exakten Wirkmechanismus' und basierend auf rein empirisch-klinischer Erfahrung werden z.B. schon seit einiger Zeit Medikamente wie Pentoxifyllin oder Dexamethason zur Linderung der Nebenwirkungen der Radiotherapie verabreicht (Hallahan et al. 1994), von denen wir heute erst beginnen zu verstehen, wie sie ihre benefizielle(n) Wirkung(en) z.B. durch Inhibition unerwünschter Synthese des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) erzielen könnten (Hallahan et al. 1994). Diese Kenntnis verdanken wir der ernsthaften Einbeziehung von "Nicht-DNA"-Targets in strahlenbiologische Untersuchungen, die entgegen etablierter Lehrmeinung die Beeinflußbarkeit von Enzymaktivitäten durch relativ niedrige Dosen (2-10 Gy) ionisierender Strahlung belegen (vgl. Uckun et al. 1993; Haimovitz-Friedman et al. 1994a; Stevenson et al. 1994).

Bei den Untersuchungen an "Nicht-DNA"-Targets zeigte sich in vielen Fällen die grundsätzliche Strahlensensitivität von Elementen intrazellulärer Signaltransduktionswege (Woloschak et al. 1990; Hallahan et al. 1989, 1991, 1991a, 1991b, 1994 und 1994a; Uckun et al. 1992 und 1993; Haimovitz-Friedman et al. 1994; Kaffenberger & van Beuningen 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen und erweitern diese Befunde. Unsere Experimente unterscheiden sich von vielen anderen der obengenannten, die z.B. nur mRNA-Analysen vorgenommen haben, dadurch, daß unsere Untersuchungen einen klinisch relevanten Endpunkt, die "respiratory burst"-Reaktion von Phagozyten, mit einbeziehen. Deren Bedeutung für den Organismus wird im klinischen Erscheinungsbild der "chronic granulomatous disease", bei der eine "burst"-Dysfunktion vorliegt (Babior & Woodman 1990; Smith & Curnutte 1991), besonders deutlich.

Darüber hinaus haben unsere eigenen Untersuchungen an Patienten mit Hals-Kopf-Tumoren unter einer Radiochemotherapie bereits gezeigt, daß 1) eine Dysfunktion dieser Immunfunktion positiv mit einem signifikant kürzeren Überleben der Patienten korreliert ist (Kaffenberger et al. 1992), und daß 2) die "burst"-Antwort der Granulozyten in vitro eine wichtige Komponente eines früh während der Therapie anzeigenden immunologischen "outcome scores" für den Therapieerfolg und für eine individuelle "Empfindlichkeit" in dieser Patientengruppe darstellen kann (Kaffenberger et al. 1995). Eigene Unter-

suchungen an Opfern des Reaktorunfalls in Chernobyl haben schließlich mit z.T. extrem erhöhten "respiratory burst"-Reaktionen verdeutlicht, daß diese Funktion noch Jahre nach einer massiven Strahlenexposition deutlich fehlreguliert sein kann (Kaffenberger et al. 1996). Eine solche stark erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wird für viele pathophysiologische Zustände (mit)verantwortlich gemacht (vgl. Jackson & Cochrane 1988; Weiss 1989; Styrt 1990; Ward & Mulligan 1992; Varani & Ward 1994).

Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der beobachteten Dysfunktion der "burst"-Reaktion, z.B. der Prozesse der intrazellulären Signaltransduktion, die zu ihrer Auslösung führen, waren allerdings unter den Bedingungen dieser klinisch-orientierten Studien nicht möglich. Die zum "respiratory burst" führenden Wege der intrazellulären Signalweiterleitung wurden deshalb als zentrale Fragestellung in der vorliegenden Arbeit analysiert. Als Modelle dienten bestrahlte reife neutrophile Granulozyten des Menschen und die humane Promyelozyten-Zelllinie HL-60 nach deren Induktion zur Differenzierung zu einer Neutrophilen-ähnlichen Zelle.

4.1 Diskussion des HL-60 Modells

4.1.1 Diskussion des Promyelozyten-/Progenitor-Status' der HL-60 Zellen

Die vorliegenden Untersuchungen wurden teilweise an der Promyelozytenleukämie-Zelllinie HL-60 vorgenommen, die bereits seit einiger Zeit als Modell für myelopoetische Proliferation und induzierbare Differenzierung in vitro gut etabliert ist (Collins et al. 1980; Fischkoff et al. 1984; Hutt-Taylor et al. 1988). In jüngster Zeit wurde allerdings die Einstufung der HL-60 Zelle als Promyelozyt ernsthaft in Frage gestellt (Drexler et al. 1995). Die Zweifel stützen sich auf eine bereits Ende der 80er Jahre erfolgte erneute Aufarbeitung (Dalton et al. 1988) des archivierten Materials von 1976, das damals zur Diagnose "akute Promyelozytenleukämie" geführt hatte (Collins et al. 1977). Die Neubewertung führte zu der revidierten Diagnose "akute myeloische Leukämie" (Dalton et al. 1988), die in einem "diskreten Stadium der Differenzierung zwischen dem späten Myeloblasten und dem Promyelozyten" angesiedelt sein soll (Drexler et al. 1995). Die Unsicherheit der Einstufung ist bedingt durch nicht eindeutige morphologische und immunphänotypische Erscheinungsbilder, die auch durch zytochemische Analysen (Esterase-, Myeloperoxidase-, Annexin VIII-Expression) nicht zweifelsfrei geklärt werden konnten (Drexler et al. 1995). Gegen eine Klassifizierung der HL-60 Zelle als Promyelozytenleukämie soll auch das Fehlen der dafür als typisch angesehenen chromosomalen Translokation zwischen den Chromosomen 15 und 17 [t(15;17)] sprechen (Drexler et al. 1995). Trotz der Neubewertung der HL-60 Zelllinie behält sie natürlich auch weiterhin ihren Stellenwert als

geeignetes Modell für Untersuchungen zur Leukämie-Entstehung und zur Modulation der Differenzierung entlang der verschiedenen Reifungslinien (Drexler et al. 1995).

Unsere Ergebnisse belegen, daß auch die von uns verwendeten HL-60 Zellen (es sollen mehrere verschiedene Subklone existieren; Toksoz et al. 1982; Birnie 1988; Fischkoff et al. 1990; Fibach et al. 1991) sich uninduziert und nach Induktion der Differenzierung durch DMSO ähnlich den Beschreibungen in der Literatur verhalten. Die beobachtete durchschnittliche Verdopplungszeit uninduzierter Zellen liegt mit ca. 23 h am unteren Ende der früher publizierten Zeitspanne von 20 - 45 h (Birnie 1988), ist jedoch weit entfernt von den 55 - 60 h der Originalzellen (Drexler et al. 1995). Als Ursache dafür ist die Selektion schnellwachsender Zellen innerhalb der Kultur im Laufe der Langzeit-Kultivierung der Zelllinie anzunehmen (Drexler et al. 1995). Induktion der Differenzierung mit DMSO verursacht einen Rückgang der Proliferation mit ca. 75% niedrigeren Zelldichten als in uninduzierten Kulturen, ähnlich den Befunden von Boyd & Metcalf (1984). Dieser Effekt wird von einer Bestrahlung unmittelbar vor DMSO-Zugabe weiter verstärkt. Die zeitliche Abfolge von Bestrahlung unmittelbar gefolgt von der DMSO-Applikation wurde bewußt gewählt, um die Strahlenschutzwirkung des Induktors (Moulder et al. 1978) zu umgehen.

Hinsichtlich ihrer Radiosensitivität unterscheiden sich die hier untersuchten HL-60 Zellen mit ihren strahlenbiologischen Kenngrößen D_0 (0,63 Gy), als ein Maß für die intrinsische Strahlenempfindlichkeit, und D_q (0 Gy), als ein Maß für die Fähigkeit der Zellen den sublethalen Strahlenschaden zu reparieren (Hall 1994; Fuks et al. 1995), nicht wesentlich von anderen HL-60 Klonen, über die in der Literatur berichtet wird (D_0 : 0,83 - 1,7 Gy, D_q : 0,13 - 0,8 Gy; Weichselbaum et al. 1981; Rhee et al. 1985; Laver et al. 1986). Sie liegen damit auch in den Größenordnungen von D_0 - und D_q -Werten, die für humane hämatopoetische Progenitorzellen publiziert sind (Grilli et al. 1982; FitzGerald et al. 1986; Lehnert et al. 1986; Laver et al. 1987; Nothdurft 1991). Die benutzten HL-60 Zellen können also hinsichtlich ihrer Strahlenempfindlichkeit als humanen Progenitorzellen vergleichbar angesehen werden.

4.1.2 Diskussion der immunphänotypischen Veränderungen induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen

Die Induktion zur granulozytären Differenzierung der HL-60 Zellen (mit DMSO) führt zu bedeutsamen Veränderungen, die durch ionisierende Strahlung beeinflusst werden können. Die Veränderungen betreffen - neben der Einstellung der Proliferation und dem Verlust der Immortalität der uninduzierten HL-60 Zellen - sowohl das phänotypische Erscheinungsbild der Zellen als auch ihre funktionellen Fähigkeiten (s. Kap. 4.1.3). Die letzteren sind

z.T. mit dem ersteren gekoppelt (Expression eines funktionellen Formylpeptid-R), erfolgen z.T. aber auch Phänotyp-unabhängig (Entwicklung der Empfindlichkeit von PI3-K-Aktivität auf LY294002; s. Kap. 4.1.4).

Der Phänotyp undifferenzierter und differenzierter HL-60 Zellen ist charakterisiert durch das Fehlen typischer Antigene der lymphozytären Reihe, jedoch mit Ausnahme des Markers für T-Helferzellen, CD4. Dessen relativ schwache Expression auf ca. 30% der uninduzierten Zellen ist angesichts einer ebenfalls schwachen Ausprägung des CD4-Antigens auf reifen humanen Monozyten (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch 1993; nicht publizierte eigene Beobachtung) und der Induzierbarkeit von HL-60 Zellen zur Differenzierung entlang der monozytären Reihe (Rovera et al. 1979) kein überraschender Befund. Dazu paßt auch das Vorhandensein des CD14-Antigens [Rezeptor für den Komplex Lipopolysaccharid (LPS)/LPS-Bindungsprotein], das - neben der starken Ausprägung auf Monozyten - auch in reifen Granulozyten noch schwach exprimiert wird (nicht publizierte eigene Beobachtung).

Die anderen phänotypischen Merkmale aus der Familie der β_2 -Integrine (CD11b und CD11c) und die Fc-Rezeptoren für Immunglobulin G (Fc γ R; CD16, CD32 und CD64) werden großteils auch von anderen Studien als Kriterien für Differenzierungsvorgänge aufgeführt (Leglise et al. 1988; Fanger et al. 1989; Dyballa 1995). Die dabei beobachteten Divergenzen in der Expression dieser Antigene sind z.T. sowohl auf die Verwendung unterschiedlicher monoklonaler Antikörper (Zusammenstellung in einer Dissertation, Dyballa 1995) als auch auf das Vorhandensein verschiedener HL-60 Subklone (Toksoz et al. 1982) in Kombination mit der bekannten phänotypischen Instabilität von HL-60 Zellen (Ross et al. 1986; Leglise et al. 1988) zurückzuführen. Die eigenen Daten unbestrahlter Zellen passen zu den publizierten (Leglise et al. 1988; Dufer et al. 1989; Taetle et al. 1991) und stimmen z.B. hinsichtlich der relativen Expressionsdichte für die drei Fc γ R (CD32 > CD64 > CD16) sehr gut mit diesen überein (Fanger et al. 1989). Unsere Ergebnisse bestätigen auch hinsichtlich der konstitutiven Expression des CD15-Antigens die Neuklassifizierung der HL-60 Zelle als "Nicht-Promyelozyt". Promyelozyten sind u.a. als CD15-negativer Zelltyp beschrieben (Grignani et al. 1994; Drexler et al. 1995).

Nach Bestrahlung und DMSO-Applikation wird ein charakteristischer Verlauf des Anteils Antigen-/Rezeptor-positiver Zellen beobachtet, der (dosisabhängig) zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung (2 bis 4 Tage) einen höheren Anteil positiver Zellen als in Kontrollen aufweist. Die Ursache für diese Erhöhung ist bisher nicht geklärt. Da die Antigen-/Rezeptor-Expression als Indiz für Differenzierung angesehen wird (s.o.), wäre die Option, daß ionisierende Strahlung Differenzierungsprozesse auch in Tumoren auslösen könnte, eine überaus interessante Hypothese, welche die strahlenbiologische Forschung im Hinblick auf ihre Anwendung in der Strahlentherapie sehr unterstützen würde. Zumindest für Fibroblasten (Rodemann et al. 1991) und für eine erythroleukämische Zelllinie (Schwenke

et al. 1995) sind strahleninduzierte Differenzierungen beschrieben (Review: von Wangenheim et al. 1995).

Alternativ ist beim erhöhten Anteil Antigen-exprimierender Zellen nach Bestrahlung auch die Möglichkeit der Stimulation individueller Zellen im Sinne einer "Aktivierung" zu bedenken, die z.B. aus intrazellulären Speichern fertige Rezeptormoleküle nach Aktivierung in die Plasmamembran integrieren. Solche Effekte sind praktisch für alle dahingehend untersuchten Strukturen beschrieben (vgl. van Epps et al. 1990; Ziegler-Heitbrock & Ulevitch 1993) und könnten evtl. über die strahleninduzierte Induktion von TNF- α (Hallahan et al. 1989, 1991 und 1994) mit seinem großen Potential an stimulatorischen Wirkungen erklärt werden. Eigene nicht gezeigte Ergebnisse belegen die Sekretion von TNF- α durch unseren HL-60 Klon. Bei den durchflußzytometrischen Analysen bilden Antigen-positive HL-60 Zellen - anders als bei der Lymphozyten-Phänotypisierung - keine eigene, klar abgegrenzte Population. Vielmehr werden sie nur durch eine "Marker"-Setzung anhand der Negativkontrolle als solche definiert. Derart "aktivierte" Zellen könnten durch ihre erhöhte Antigen-Expression artefiziell als "positiv" und damit differenziert(er) identifiziert werden. Dagegen spricht auch nicht die beobachtete Stabilität der als Fluoreszenzintensität gemessenen relativen Rezeptordichte (Ergebnisse nicht gezeigt). "Aktivierte" Zellen müssen sich in ihrer Rezeptordichte nicht von differenzierteren Zellen unterscheiden und tragen so - zwar bei erhöhtem Anteil - zur unveränderten Rezeptordichte aller "positiven" Zellen bei.

Der Verlauf der Rezeptorpositivität, besonders für CD14 und CD11c, die in jüngster Zeit beide als Rezeptoren für bakterielles Endotoxin (LPS) diskutiert werden (Ingalls & Golenbock 1995), ist gekennzeichnet durch einen Abfall der Anteile positiver Zellen an der Gesamtpopulation im Zeitraum 4 bis 5 (6) Tage nach Induktion der Differenzierung mit und ohne Bestrahlung. Eine Möglichkeit zur Erklärung dieses Phänomens bietet die Zeitgleichheit dieser Erscheinung mit Apoptose-Beobachtungen in der Kultur (Abend et al. 1995), die in einem Selektionsprozeß für reifere Zellstadien den vorübergehenden Abfall bedingen könnte. Die große Bereitschaft von HL-60 Zellen in Apoptose zu gehen wird auch nach UV-B-Bestrahlung beschrieben (Martin & Cotter 1991) und wird ebenfalls bei (isolierten) Granulozyten im Laufe des Alterungsprozesses beobachtet (Savill et al. 1989; Riehemann & Sorg 1996). Ungeklärt bleibt in diesem Zusammenhang die Frage, warum nicht alle gemessenen Epitope (CD11b, f-MLP-R) im Zeitraum 4 bis 5 Tage nach Induktion einen Abfall zeigen. Ein weiterer Mechanismus in der Regulation ihrer Expression könnte hier eine Erklärung sein.

Die beobachteten Veränderungen in der Expression des Formylpeptid-R (FPR oder f-MLP-R) sind für diese Arbeit von besonderem Interesse. Sein Erscheinen und seine Funktionalität stellen das Bindeglied zwischen den hier diskutierten immunphänotypischen Veränderungen induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen einerseits und dem Hauptaspekt

der vorliegenden Arbeit, den Untersuchungen der Signalübertragung zur Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion (unter dem Einfluß ionisierender Strahlung), andererseits dar. Die Expression des Formylpeptid-R ist relativ gut sowohl in HL-60 Zellen, aus denen die Klonierung des FPR-Genes gelang (Boulay et al. 1990), als auch in Neutrophilen untersucht (Niedel et al. 1980; Schmitt & Bültmann 1990; Kew et al. 1992; Perez et al. 1992). Unsere Beobachtungen stimmen mit denen von Niedel et al. (1980) überein, die ebenfalls bis zu 30% FPR-positive Zellen in den ersten 4 Tagen nach DMSO-Gabe berichten. Auch der in den ersten beiden Tagen beobachtete Funktionsdefekt des FPR hinsichtlich der Stimulierbarkeit des "respiratory burst" (vgl. Abb. 16), findet eine Bestätigung in der Literatur. Chaplinski & Niedel (1982) machten die Beobachtung bei HL-60 Zellen, die mit Dibutyryl-cAMP zur granulozytären Differenzierung induziert worden waren. Das plötzliche Einsetzen der Stimulierbarkeit der Zellen über den FPR am 3. Tag nach DMSO-Gabe kann nicht mit einer veränderten FPR-Dichte, die von Tag 2 nach Tag 3 nur unbedeutend angestiegen ist (Ergebnisse nicht gezeigt; Kaffenberger & van Beuningen 1994), erklärt werden. Vielmehr ist an einen unreifen Signaltransduktionsweg des FPR (s. Kap. 4.2.3.1) zu denken, dessen Defekt weiterer Abklärung bedarf. Unter der Annahme, daß das $p67^{phox}$ -Protein (s. Kap. 1.1.3) ein essentielles Element des NADPH-Oxidase-Komplexes darstellt, kann auch eine verzögerte Verfügbarkeit dieses Proteins im Differenzierungsprozeß (Levy et al. 1990) als Ursache des Funktionsdefektes ausgeschlossen werden, denn die PMA-stimulierte Reaktion setzt bei unseren Zellen im Gegensatz zu dem von Levy et al. verwendeten HL-60 Klon bereits am 2. Tag ein.

4.1.3 Diskussion der funktionellen Veränderungen induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen

Wie der frühzeitigen Expression des FPR nach Induktion der Differenzierung der HL-60 Zellen (s. Kap. 4.1.2), muß auch den Mechanismen des Phagozytosevorgangs bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes (7 d nach DMSO-Gabe) ein gewisser Grad an Unreife beigemessen werden. Undifferenzierte HL-60 Zellen vermögen nicht zu phagozytieren und erreichen im differenzierten Zustand nur einen Anteil Phagozytose-aktiver Zellen von ca. 60%. Unter Verwendung desselben Kits (opsonierte *E. coli*-Bakterien) werden aus Vollblut gesunder Spender routinemäßig > 95% Phagozytose-aktive Granulozyten und ca. 75% aktive Monozyten bestimmt (Broschüre des Herstellers und eigene Ergebnisse; vgl. Abb. 13). Es besteht somit eine Diskrepanz zwischen der Ausprägung von Rezeptoren der Phagozytose (Komplement-R = Adhäsionsmoleküle des CD11/CD18-Komplexes, FcγR und β₁-Integrine: Petroni et al. 1988; Simms et al. 1989; Abrass 1991; Isberg & Tran Van Nhieu 1995), die von den ersten Tagen nach Induktion der Differenzierung an auf einem sehr viel höheren Anteil an Zellen in durchflußzytometrisch nachweisbarer Dichte

(geschätzt: bei > 1.000 Bindungsstellen/Zelle) vorhanden sind, als der Anteil phagozytisch aktiver Zellen unter unseren Kultur- und Meßbedingungen in vitro erreicht. Als Ursache für diese Diskrepanz sind bei nachgewiesener Adhärenz der Bakterien an die Zellen (Dyballa 1995) Defekte/Unreifeheiten von Elementen des Zytoskeletts zu diskutieren, welche evtl. die Einstülpung des Phagosoms nicht zulassen. Gegen eine solche Unreifeheit des Zytoskeletts spricht jedoch zumindest auf dem Niveau des Actins dessen Polymerisierbarkeit bereits in undifferenzierten Zellen, in die das aktive Gen des FPR transformiert wurde und die nach f-MLP-Stimulation neben Actin-Polymerisation auch einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Ausdruck einer erfolgreichen Signaltransduktion zeigten (Prossnitz et al. 1993). Die Diskrepanz zwischen Rezeptorexpression und Phagozytoseaktivität der differenzierten HL-60 Zellen muß somit derzeit unerklärt bleiben.

Signifikante Strahleneffekte auf den Adhärenz- und Phagozytosevorgang DMSO-induzierter HL-60 Zellen waren unter unseren Analysebedingungen nicht zu erkennen. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Befunden (Gallin et al. 1984), die eine ausgesprochene Strahlenresistenz des archaischen Phagozytoseprozesses belegt haben.

4.1.4 Diskussion der Veränderungen des Zytoskeletts induzierter und bestrahlter HL-60 Zellen

Auf molekularer Ebene verursacht die Induktion zur Differenzierung der HL-60 Zellen mit DMSO neben den Veränderungen in der PKC-Aktivität und deren Ansprechbarkeit durch Phorbolster (s. Kap. 3.1.4) auch die Entwicklung von Enzymaktivitäten, die als Elemente der Signaltransduktionskaskade zur Auslösung des "respiratory burst" eine wichtige Rolle spielen (s.u.) bzw. erst die strukturellen Voraussetzungen dafür schaffen.

Zu den Letzteren gehört offensichtlich eine Umorganisation des Zytoskeletts, zumindest soweit es die Actin-Komponente betrifft, die sehr eng mit der Aktivierung der NADPH-Oxidase auf verschiedenen Ebenen verknüpft sein soll (Nauseef et al. 1991; Woodman et al. 1991; Greenberg 1995; Johansson et al. 1995a; Wiles et al. 1994 und 1995). Unsere Untersuchungen zeigen auf β -Actin-mRNA-Niveau sowohl eine ausgeprägte Degradations- als auch eine Transkriptionsaktivität während der ersten Stunden nach Induktion der Differenzierung, die jedoch in einer Art von "rebound"-Phänomen zu einem Nettoanstieg des mRNA-Gehaltes gegenüber dem Niveau undifferenzierter Zellen führt. Der β -Actin-mRNA-Gehalt wird bei molekularbiologischen Untersuchungen sehr oft als interner Standard für die gleichmäßige Beladung der Gele verwendet, da von einem "house-keeping gene" eine stabile konstitutive Expression erwartet wird. Unsere Befunde stellen die Verwendbarkeit dieser mRNA - zumindest unter den Bedingungen einer induzierten Differenzierung der (HL-60) Zellen - in Frage. Ähnliche Effekte auf β -Actin-

mRNA-Niveau werden in der Leber von Ratten nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff oder partieller Hepatectomy beobachtet (Nakamura et al. 1994), jedoch ohne deren exakte Quantifizierung.

Strahlendosen von 0,5 Gy oder 1 Gy verstärken die Nettozunahme der β -Actin-mRNA mit persistierend erhöhten Gehalten während des gesamten Untersuchungszeitraumes, eine Beobachtung, die möglicherweise erneut - wie bei den verstärkten phänotypischen Veränderungen nach Bestrahlung (s. Kap. 4.1.2) - auf einen beschleunigten Reifungs-/Alterungsprozeß bestrahlter Zellen hindeutet. Durch niedrige Dosen (6 bis 100 cGy) γ -Strahlung induzierte Erhöhung der β -Actin-mRNA wurde auch bei vergleichbarer Dosisleistung von Woloschak & Chang-Liu (1991) in Fibroblasten beobachtet. Die Zunahme betrug dabei bei der höchsten Dosis 50% zum Zeitpunkt 100 min nach Bestrahlung. Besser vergleichbare Untersuchungen mit Überprüfung der Kinetik der β -Actin-mRNA Transkription über den gesamten Zeitraum einer terminalen Differenzierung von Zellen sind nicht bekannt. Diese Befunde unterstreichen somit die Wirkung relativ kleiner Strahlendosen auf zytoplasmatische Komponenten.

Auf Proteinebene werden prinzipiell ähnliche, jedoch quantitativ weniger stark ausgeprägte Veränderungen auf dem Niveau des F-Actin-Gehaltes nach dessen färberischer Darstellung mit NBD-Phalloidin gefunden. In unseren durchflußzytometrischen Analysen der HL-60 Zellen zeigen sich dabei ähnlich homogene Fluoreszenzverteilungen als Ausdruck der Gleichmäßigkeit des F-Actin-Gehaltes innerhalb der HL-60 Population wie bei Neutrophilen (Packman & Lichtman 1990). Keinen Effekt einer Retinsäure-induzierten Differenzierung von HL-60 Zellen fanden dagegen Leung et al. (1992). Die Diskrepanzen zu unseren Daten sollten jedoch angesichts der geringen Ausprägung der beobachteten Effekte, des unterschiedlichen Induktors der Differenzierung und der relativ groben Analyse mittels Durchflußzytometrie nicht überbewertet werden. Da dieses Verfahren nur ein Gesamtsignal, integriert über die gesamte Zelle, erfassen kann, könnten intrazelluläre Umverteilungen bei gleichbleibendem Gesamtgehalt des F-Actins, wie sie z.B. nach Hyperthermie-Behandlung der Zellen auftreten (van Beuningen et al., unveröffentlichte Beobachtungen), einen möglichen Strahleneffekt übersehen. Diese Untersuchungen sollten deswegen unter mikroskopischer Kontrolle der durchflußzytometrischen Ergebnisse wiederholt werden.

Die differenzierten HL-60 Zellen reagieren auch wie Neutrophile (Howard & Oresajo 1985a; Cassimeris et al. 1990; Packman & Lichtman 1990; Johansson et al. 1995a) auf den Stimulus f-MLP mit einer sehr schnellen Verdopplung des F-Actin-Gehaltes, der in Übereinstimmung mit den zuvor genannten Arbeiten nach ca. 30 sec sein Maximum erreicht und danach wieder abfällt. Dieser Rückgang des F-Actins betrifft jedoch nur ungefähr die halbe Zellpopulation, welche hinsichtlich ihres F-Actingehaltes unter das

Ausgangsniveau zurückfällt, und der mit einer effektiveren Terminierung des Stimulus in diesen Zellen erklärt werden könnte. Ähnliche Beobachtungen werden bei der Auslösung des "respiratory burst" durch f-MLP mit dem Auftreten heterogener Fluoreszenzverteilungen gemacht (Ergebnisse nicht gezeigt). Strahleneffekte waren bei diesen Untersuchungen zur f-MLP-induzierten Polymerisierbarkeit des Actins - ähnlich den Effekten beim "burst" - an HL-60 Zellen nicht feststellbar, was jedoch - wie oben ausgeführt - ein Problem des Analyseverfahren darstellen könnte.

Die Untersuchungen zu Effekten der Differenzierung und/oder Bestrahlung auf das Zytoskelett sind von besonderer Relevanz unter dem Aspekt, daß mehrere Erscheinungen im Zusammenhang mit der Initiation und Termination des "respiratory burst" unter entscheidender Mitwirkung des Zytoskeletts ablaufen sollen. Wenigstens drei Elemente des NADPH-Oxidase-Komplexes sollen mit dem Zytoskelett (Triton X-100-resistente Zellfraktion) assoziiert sein (Woodman et al. 1991). Dabei soll eine PKC-abhängige Phosphorylierung des p47^{phox}-Proteins ebenso am Zytoskelett erfolgen wie die Translokation der p47^{phox}- und p67^{phox}-Proteine zur Plasmamembran (Nauseef et al. 1991). Eine Zerlegung des F-Actin-Skeletts durch Inkubation der Zellen mit dem Pilzmetaboliten Cytochalasin B induziert eine unphysiologisch lange und starke "burst"-Aktivität (Wiles et al. 1995 und Abb. 26b), die nach Johansson et al. (1995a) mit der beeinträchtigten physiologischen Termination der Zellantwort zusammenhängen könnte. Diese Autoren diskutieren eine durch CytB-Behandlung verhinderte Assoziation des Liganden-besetzten f-MLP-R mit dem Zytoskelett, die in Neutrophilen als negativer "feedback"-Mechanismus die vom Rezeptor ausgehende Signalübertragung beenden soll. Die Assoziation des Rezeptors mit Actin verursacht dabei die Konvertierung des Rezeptors in einen Zustand hoher Affinität, der bei reduzierter GTP-Empfindlichkeit und durch Actin-vermittelte Überführung in Plasmamembran-Domänen mit depletiertem G-Protein-Gehalt die beobachtete Desensibilisierung des FPR erklären soll (Jesaitis et al. 1993).

Hinsichtlich des noch immer unbekannten Mechanismus der f-MLP-induzierten Actin-Polymerisation ist interessant, daß es Hinweise auf eine Beteiligung von Produkten der PI3-Kinase-Aktivität gibt (Eberle et al. 1990), die in Neutrophilen bereits seit einiger Zeit nachgewiesen sind (Traynor-Kaplan et al. 1989). PI3-K-Aktivität ist ein Element der f-MLP-induzierten Signaltransduktionskaskade (s. Kap. 4.2.3.1), deren Produkte - an 3'-Position-phosphorylierte(s) Phosphatidylinositol(e) [z.B. PtdIns(3,4,5)P₃] - bisher hauptsächlich als Aktivator(en) für Ca²⁺-unabhängige PKC-Isoenzyme (δ , ϵ , η und ζ) diskutiert werden (Toker et al. 1994; Lord & Pongracz 1995). Alternativ könnte eine PtdIns(3,4,5)P₃-vermittelte Aktivierung des *Rac*-Proteins aus der Familie der sog. "kleinen" G-Proteine, das eine Rolle bei der Regulation der NADPH-Oxidase spielen soll (Bokoch 1995; Quinn 1995), bei der Polymerisation des Actins beteiligt sein (Greenberg 1995). Experimentelle Evidenz dafür könnte eine kürzlich erschienene Arbeit erbracht haben, die in Fibroblasten

nach Stimulation des EGF-Rezeptors - über *Rac*-induzierte PLA_2 -Aktivität und Leukotrien-Bildung aus Arachidonsäure - die Bildung von sog. "stress fibers" des Zytoskeletts aufgezeigt hat (Peppelenbosch et al. 1995). Dies paßt zur beschriebenen Funktion des *Rac*-Proteins als ein Kontrolleur der Actin-Polymerisation an der Plasmamembran (Ridley et al. 1992; Dagher et al. 1995). Ein funktionsfähiges Zytoskelett muß deshalb als essentiell für die Physiologie der "respiratory burst"-Reaktion angesehen werden und hat über die klinischen Konsequenzen von dessen Dysfunktion/Fehlregulation ("Septische Granulomatose") eine grundsätzliche Bedeutung für die Integrität des Gesamtorganismus.

Im Hinblick auf weitere molekulare Effekte der DMSO-induzierten Differenzierung der HL-60 Zellen, die im Rahmen dieser Untersuchungen von Relevanz sind, berichten Billah et al. (1989) über die Ausprägung von PLD-Aktivität (s. Kap. 4.2.3). Unsere Arbeit erweitert deren Befund für die wichtige Enzymfamilie der PI3-Kinasen. Die eigenen Ergebnisse zeigen die Entwicklung einer Empfindlichkeit von PI3-K-Aktivität in HL-60 Zellen auf den Antagonisten LY294002 (Vlahos et al. 1994 und 1995; Nakanishi et al. 1995). Nach f-MLP-Stimulation reagieren die Zellen mit einer Reduktion der "burst"-Antwort, die von der Dosis des Antagonisten abhängig ist, und die am Tag 6 nach Induktion der Differenzierung sehr der reifer Neutrophiler ähnelt (vgl. Abb. 40). Auch hinsichtlich der relativen Resistenz nach LY294002-Behandlung gegenüber dem PMA-Stimulus zeigt sich diese Ähnlichkeit in den differenzierenden HL-60 Zellen. Die relative Empfindlichkeit f-MLP-stimulierter HL-60 Zellen auf den PI3-K-Antagonisten könnte somit einen neuen Indikator für den Differenzierungszustand der DMSO-induzierten Zellen darstellen.

In einer zusammenfassenden Bewertung kann das HL-60 Modell in der angewandten Form mit der Induktion einer terminalen Differenzierung zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen als geeignet für Untersuchungen zu intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen und deren mögliche Beeinflußbarkeit durch ionisierende Strahlung angesehen werden. Die Zellen zeigen die ihrer Abstammung entsprechende Strahlenempfindlichkeit für den klassischen Parameter Überleben und entwickeln im Laufe weniger Tage nach Induktion der Differenzierung die Voraussetzungen für derartige Analysen. Dazu gehören die Expression von Membran-ständigen Rezeptoren als Liganden-Bindungsstellen zur Initiation zellulärer Funktionen wie Chemotaxis, Phagozytose und "respiratory burst". Rezeptoren sind als potentielle Ausgangspunkte für intrazelluläre Signaltransduktionswege anzusehen. Außerdem zeigen differenzierte HL-60 Zellen nach der Aktivierung von Signaltransduktionswegen, in die mit pharmakologischen Mittel zum Zwecke der Aufklärung der Wege gut eingegriffen werden kann, mit der "respiratory burst"-Reaktion einen relativ gut meßbaren biologischen Endpunkt mit klinischer Relevanz.

4.2 Diskussion der Signalübertragung zur Aktivierung des "respiratory burst"

Trotz intensiver Forschung während der vergangenen 30 Jahre blieben viele Probleme der intrazellulären Signalübertragung zur Aktivierung des Neutrophilen offen (vgl. z.B. McPhail et al. 1993; Thelen et al. 1993; Thelen & Wirthmueller 1994; Downey et al. 1995). Dieser Mangel besteht weiterhin und ist zu bedauern angesichts der überragenden Bedeutung dieser Zellen für die Infektabwehr einerseits und ihrer Dysfunktion in pathologischen Zuständen andererseits. Die vorliegende Arbeit versucht einen Beitrag zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der "respiratory burst"-Reaktion der Neutrophilen/HL-60 Zellen zu leisten.

4.2.1 Methodische Aspekte

Die Ergebnisse zur Signalübertragung bei der Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase wurden in erster Linie durch folgenden methodischen Ansatz gewonnen: Nach Stimulation der Zellen mit einem von drei Agonisten (dem Phorbolester PMA, dem Chemotaxin f-MLP und Immunkomplexen), die - so die Annahme - initial drei unterschiedliche Signaltransduktionswege benutzen, wurde die Aktivität der Oxidase in erster Linie durch zwei verschiedene Methoden (Durchflußzytometrie, Chemolumineszenz) bestimmt. Gegen vermutete Komponenten der postulierten "Pathways" kamen Antagonisten zum Einsatz, um durch diese pharmakologische Modulation die mögliche Beteiligung der postulierten Elemente der Signaltransduktion genauer einschätzen zu können. Die Präsenz einzelner Proteine der Signaltransduktion und ggf. deren Modifikation nach Aktivierung der Zellen wurde im "Western blot"-Verfahren belegt, die Veränderungen von Lipid-"2nd-messenger"-Substanzen (Diacylglycerole) quantitativ mit HPLC bestimmt.

Die durchflußzytometrische Messung der "respiratory burst"-Aktivität verwandte das Rhodamin-Derivat, Dihydrorhodamin 123 (DHR 123; Rothe et al. 1988 und 1991; Emmendorfer et al. 1990; Royall & Ischiropoulos 1993), als Indikator für die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies. In Vorversuchen hatte sich im Vergleich mit Dichlorfluorescein [DCF(H); Bass et al. 1983] die Überlegenheit des oxidierten fluoreszierenden Produkts Rhodamin 123 bezüglich seiner praktisch uneingeschränkten Akkumulation nach Stimulation von HL-60 Zellen gezeigt, da es in Mitochondrien angereichert wird, für die es als Vitalfarbstoff dient (Kinsey et al. 1987; Royall & Ischiropoulos 1993). Dagegen zeigte DCF(H) in Übereinstimmung mit den Befunden von Royall & Ischiropoulos (1993) nach längerer Inkubationszeit (> 30 min) an HL-60 Zellen, nicht an Granulozyten, die Tendenz zur Rückdiffusion in das Medium, ein Befund, der ein Fragezeichen hinter die Membran-

integrität länger inkubierter HL-60 Zellen setzt. Auch angesichts der deutlich höheren Empfindlichkeit des DHR 123 im Vergleich mit allen anderen durchflußzytometrischen Indikatoren für "burst"-Aktivität (Smith & Weidemann 1993; Vowells et al. 1995) erwies sich die Entscheidung für diesen Indikator, besonders unter dem Aspekt des kleinen f-MLP-vermittelten Signals in HL-60 Zellen, als absolut indiziert.

Diese hohe Sensitivität des DHR 123 muß allerdings mit einem Verlust an Spezifität für eine bestimmte Sauerstoffspezies erkauft werden. Während die ursprünglich postulierte Spezifität von DCF(H) für H_2O_2 (Bass et al. 1983) in jüngerer Zeit auch angezweifelt wurde (Royall & Ischiropoulos 1993), spricht die deutlich ausgeprägtere Verstärkbarkeit der DCF- im Vergleich mit der DHR 123-Fluoreszenz durch Inhibition der H_2O_2 -abbauenden Enzyme (Katalase und Myeloperoxidase) mittels Natrium-Azid (Borregaard 1988 und eigene Beobachtung) für eine höhere Spezifität des DCF für H_2O_2 als des DHR 123. Trotz dieser Einschränkung hinsichtlich der Spezifität von DHR 123 für eine bestimmte Sauerstoffspezies - in jüngster Zeit werden auch Superoxidanionen (Henderson & Chappell 1993) sowie Stickoxide (Kooy et al. 1994) als Oxidanzien für DHR 123 diskutiert - hat sich dieser Indikator für durchflußzytometrische "respiratory burst"-Messungen durchgesetzt (Emmendorffer et al. 1990; Smith & Weidemann 1993; Kaffenberger & van Beuningen 1994; Bueb et al. 1995; Vowells et al. 1995).

In ähnlicher Weise ist die Luminol-abhängige Chemolumineszenz als hochsensitives Verfahren zur Messung von "respiratory burst"-Aktivität etabliert, jedoch auch hier verbunden mit sehr viel Unklarheit hinsichtlich der dabei ablaufenden chemischen Prozesse (Wang et al. 1991a und 1993; Edwards 1994; H. de Groot, persönl. Mitteilung, Februar 1995; Château et al. 1996). Das Luminol-abhängige Chemolumineszenz-Signal sollte ursprünglich direkt proportional zur Rate des durch spontane Dismutation gebildeten H_2O_2 sein (Wymann et al. 1987a). Die Aufklärung der Reaktionsmechanismen des lumineszierenden Agens wird durch das Fehlen spezifischer Inhibitoren für relevante Enzyme (Myeloperoxidase, Katalase) entscheidend behindert (Smith & Weidemann 1993). Der von uns angewandte Reaktionsansatz enthält exogene (Meerrettich)-Peroxidase, um - unabhängig von der (endogene Myeloperoxidase-bereitstellenden) Degranulierung nach Stimulation der Zellen - genügend Enzymaktivität für eine möglichst komplette Erfassung aller "respiratory burst"-Produkte zu gewährleisten (Edwards 1987). Luminol ist als membrangängiges Molekül im Gegensatz zu Lucigenin, das die Zellmembran nicht passieren kann und bevorzugt nach extrazellulär abgegebenes Superoxidanion erfäßt, auch in der Lage intrazellulär gebildete Sekundärmetabolite der "burst"-Reaktion (H_2O_2 , HOCl sowie ggf. Stickoxide) zusätzlich zu detektieren (DeChatelet et al. 1982; Brestel 1985; Wymann et al. 1987a; Wang et al. 1991a und 1993; Edwards 1994). Die Aussagekraft der Lucigenin-Methode ähnelt damit eher der des NBT-Verfahrens (Breitman et al. 1980), während der Luminol-Ansatz besser mit den durchflußzytometrischen Techniken (s.o.) übereinstimmt.

Das Chemolumineszenz-Verfahren ermöglicht sowohl die aktuelle Bestimmung der NADPH-Oxidase-Aktivität zum jeweiligen Meßzeitpunkt, als auch - durch Integration der Meßsignale über die Zeit - eine der durchflußzytometrischen Messung vergleichbare Aussage und erlaubt damit den direkten Vergleich der beiden Meßergebnisse untereinander. Beiden Verfahren gemein ist - bei vorsichtiger Formulierung - ihre Verwendbarkeit als Indikatoren für eine "Veränderung in der generellen zellulären Produktion von Oxidanzien" (Royall & Ischiropoulos 1993).

4.2.2 Diskussion der verwendeten Stimuli des "respiratory burst"

Die drei ausgewählten Stimuli des "respiratory burst" in Neutrophilen/HL-60 Zellen sollten die Reaktion initial über verschiedene "Pathways" auslösen (vgl. Abb. 4). Es sollte 1) eine Rezeptor-unabhängige Stimulation erfolgen, 2) eine Stimulation ausgehend von einem Rezeptor für chemotaktische Signale und 3) eine Stimulation, welche dem Phagozytosevorgang sehr nahe kommt.

zu 1) Der als Tumorpromotor bekannte Phorbol ester PMA ist ein zwar unphysiologischer, aber dennoch etablierter Agonist für viele zelluläre Reaktionen, einschließlich des "burst" in Neutrophilen. Er kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften problemlos die Plasmamembran penetrieren und bindet als stereospezifisches Analogon (Hecker 1978) anstelle der physiologischen Aktivatoren Diacylglycerole an Isoenzyme aus der Familie der Proteinkinasen C (Nishizuka 1988 und 1992). Deren Klassifizierung in PKC-Gruppen ("klassische", "neue" und "atypische" Isoenzyme) basiert u.a. auf ihrer unterschiedlichen Aktivierbarkeit durch PMA (Hug & Sarre 1993; Lord & Pongracz 1995). Aufgrund der langsamen Verstoffwechselung des Phorbol esters kommt es zu einer sehr (unnatürlich) langen Aktivierung der PMA-empfindlichen Isoenzyme der "klassischen" und "neuen" Gruppen (Lord & Pongracz 1995), die mit einer entsprechend starken Aktivierung des "respiratory burst" (vgl. Abb. 26b) ohne Veränderung der zytoplasmatischen $[Ca^{2+}]$ -Konzentration einhergeht (Ozaki & Kume 1988; Lund-Johanson & Olweus 1992). Infolgedessen, kann eine PMA-Stimulation der Zellen unproblematisch in einem Ca^{2+} -freien Medium (hier: PBS) erfolgen, wogegen die (Formylpeptid)rezeptor-vermittelte Reaktion mit einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aus zytoplasmatischen Speichern, und zur vollen Aktivierung auch aus dem extrazellulären Milieu, begleitet ist (Edwards 1994) und deswegen in einem Ca^{2+} -haltigen Puffer-System (hier: Hanks'-Puffer) erfolgte.

zu 2) Aus den Veränderungen heraus, welche die Expression des Formylpeptid-Rezeptors im Zuge der Differenzierung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen erfährt (vgl. Kap. 4.1.2), war es naheliegend, die Signaltransduktion, welche von diesem Rezeptor ihren Ausgang nimmt, zu studieren. Dieser Rezeptor gehört in die große Familie der hepta-

helikalen oder "serpentine" Rezeptoren, die durch sieben transmembranöse Domänen ausgezeichnet sind (Thelen et al. 1993). Nach Bindung des Liganden (hier: f-MLP) findet über G-Proteine die Kopplung an ein Effektorsystem statt, das im klassischen "Pathway" von PtdIns-PLC gebildet wird. Seine Aktivität führt zur Bildung der beiden "2nd messenger" Diacylglycerol und Inositoltriphosphat, wobei das letztere durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (s.o.) zur Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger PKC-Isoenzyme durch DAG und anderer Phospholipasen (s. Kap. 4.2.3) mit beiträgt.

Die volle Stimulierbarkeit der f-MLP-induzierten "respiratory burst"-Reaktion setzt die Vorbehandlung ("priming") der Zellen mit CytB zur Verhinderung der physiologischen Termination durch ein intaktes Actin-Zytoskelett (s. Kap. 4.1.4; Wiles et al. 1995) - als eine Möglichkeit des noch immer unverstandenen CytB-"primings" - voraus. Die von uns eingesetzte CytB-Konzentration lag mit 10 μM im Bereich der üblicherweise angewandten Konzentrationen (Tyagi et al. 1989; Cassimeris et al. 1990; Agwu et al. 1991; Johansson et al. 1995).

zu 3) Der dritte Stimulus sollte die Rezeptoren für Immunglobuline der G-Klasse ($\text{Fc}\gamma\text{R}$) ansprechen und damit unter in vitro-Bedingungen der Aktivierung der Zellen wie beim Vorgang der Phagozytose möglichst nahe kommen. Es wurden deswegen unlösliche Immunkomplexe (BSA, komplexiert mit Antikörpern gegen BSA) und zu einem geringeren Teil auch gepooltes Humanserum mit nachfolgender Quervernetzung durch Antikörper gegen humane Immunglobuline als Stimuli der $\text{Fc}\gamma\text{R}$ eingesetzt. Damit verband sich auch die Hoffnung, neue Aufschlüsse über diesen - in Phagozyten - relativ wenig untersuchten Weg der Signaltransduktion zu erhalten. Außerdem sollte in diesem "Pathway" ein weiterer Mechanismus der intrazellulären Signalweiterleitung, nämlich die Phosphorylierungen an Tyrosinresten von Proteinen untersucht werden.

4.2.3 Diskussion der Beteiligung von Elementen der intrazellulären Signalübertragung bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion und ihre Strahlenempfindlichkeit

Aus der Einleitung (vgl. Kap. 1.1.3) ergibt sich, daß ein Inhibitor der NADPH-Oxidase - unabhängig von der angewandten Aktivierung der Neutrophilen/HL-60 Zellen - zu einer im Rahmen der Meßempfindlichkeit kompletten Hemmung der als "respiratory burst"-Reaktion angesehenen Meßsignale führen sollte. Unsere Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur (Robertson et al. 1990) durch Vorinkubation der Zellen mit Diphenylenjodonium-Jodid gegenüber allen drei Stimuli eine totale Inhibition. Der Antagonist bindet vermutlich an die FAD-Bindungsstelle der Cytochrom b₅₅₈-Komponente der Oxidase (Stuehr et al. 1991). Daraus folgt, daß die von uns gemessene Oxidation

des DHR 123 sowie das Luminol-abhängige Chemolumineszenzsignal (vgl. Abb. 14 und 26b) als relative Maße für "respiratory burst"-Aktivitäten angesehen werden dürfen.

Die "respiratory burst"-Reaktion der Neutrophilen/HL-60 Zellen ist in ihrer Gesamtheit in Übereinstimmung mit kürzlich publizierten Daten (Ueta & Osaki 1996) als relativ strahlenresistent zu bezeichnen. Während die Chemotaxin (f-MLP)-induzierte Zellantwort weder kurz- noch längerfristig (Messungen an Granulozyten unmittelbar nach 5 Gy und Messungen an HL-60 Zellen nach 1 Gy ab Tag 0 bis Tag 7) beeinflussbar war, zeigten sich nach PMA- oder Immunkomplex-Stimulation von Neutrophilen in der Chemoluminometrie reproduzierbare Reduktionen gegenüber den unbestrahlten Kontrollen. Diese dürfen jedoch mit < 10% biologisch oder klinisch unbedeutend sein. Dem gegenüber steht allerdings die Beobachtung der mit bis zu 40% deutlich stärkeren Inhibition der FcγR-vermittelten Reaktivität bei durchflußzytometrischer Analyse von Granulozyten, die unmittelbar zuvor mit 5 Gy bestrahlt worden waren.

4.2.3.1 PMA- und f-MLP-induzierte Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase

Bei einer derartigen Endpunktmessung nach Stimulation der Zellen können natürlich keine exakten Angaben zu den beschrittenen Signaltransduktionswegen und den dabei beteiligten Elementen (Enzyme, Metabolite, etc.) gemacht werden. Deswegen wurde versucht, durch pharmakologische Blockade von vermuteten Komponenten der Signalübertragung zur Auslösung der "burst"-Reaktion deren Beteiligung an den Aktivierungsmechanismen näher zu bestimmen. Die Analysen dienen als Plattform für Untersuchungen zur Strahlensensitivität der Elemente. Diese werden nachfolgend im einzelnen diskutiert. Eine zusammenfassendes Schema (Abb. 49) der Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase findet sich auf Seite 127.

4.2.3.1.1 Bedeutung der Proteinkinasen C (Vorkommen von Isoenzymen, Aktivität, Translokation; Strahlenempfindlichkeit)

Der Enzymaktivität aus der Familie der PKC-Isoenzyme wird seit langem eine zentrale Stellung bei der Regulation des "respiratory burst" eingeräumt (Lambeth 1988; Dewald et al. 1989; Thelen et al. 1993). Unsere Untersuchungen mit dem "Western blot"-Verfahren haben gezeigt, daß in undifferenzierten HL-60 Zellen zumindest die Isoenzyme PKC α , - β _I und - β _{II} vorliegen, und die Zellen sich somit hinsichtlich der Expression dieser Isoenzyme nicht von reifen Neutrophilen unterscheiden (Stasia et al. 1990; Majumdar et al. 1991; Thelen et al. 1993; unsere Ergebnisse).

Daran änderte auch die Induktion der Differenzierung der HL-60 Zellen mit DMSO nichts Wesentliches, im Gegensatz zu publizierten Untersuchungen, in denen jedoch auch keine einheitlichen Veränderungen beobachtet wurden (Edashige et al. 1992; Tanaka et al. 1992; Seibenhener & Wooten 1993). Z.B. beschreiben Tanaka et al. (1992) einen zwei- bis

dreifachen Anstieg während der ersten 3 Tage der DMSO-Behandlung für eine β -Isoform, während Seibenhener & Wooten (1993) ein Maximum des PKC β -Gehalts bei 6 h mit einem kontinuierlichen Abfall auf ein nicht nachweisbares Niveau am 5. Tag zeigen. Eine Behandlung der HL-60 Zellen mit 10 nM PMA regulierte innerhalb von 16 h PKC α deutlich hoch und PKC β herunter (Edashige et al. 1992), wogegen Seibenhener & Wooten (1993) bei 100 nM PMA bereits nach 6 h eine über 5 Tage stabil reduzierte Expression von PKC α auf kaum nachweisbarem Niveau bei gleichzeitig konstant erhöhter PKC β -Expression berichten. Angesichts der bereits oben geführten Diskussion um das Vorliegen verschiedener HL-60 Klone (vgl. Kap. 4.1.1), müssen unserer Befunde nicht überraschen. Darüber hinaus könnten die beobachteten Diskrepanzen in der Literatur und im Vergleich mit unseren eigenen Daten auch auf die Verwendung unterschiedlicher Antikörper zum Nachweis der Isoformen zurückzuführen sein. Die Isoformen γ und ϵ sollen nur nach chromatografischer Anreicherung detektierbar sein (Seibenhener & Wooten 1993) und wurden entsprechend bei den hier angewandten Nachweisverfahren nicht gefunden.

Bei der Gesamtzym-Aktivität unfractionierter Zellaufschlüsse ohne PMA-Stimulation der Zellen ergab sich jedoch bei Bezug auf die gleiche Anzahl eingesetzter Zellen eine deutliche Abnahme auf ca. 73% 4 - 6 Tage nach DMSO-Induktion, die bei bestrahlten (1 Gy am Tag 0) Zellen um weitere 10% auf ca. 63% ($n = 4$) abgefallen war. Da jedoch die Zellen unter Differenzierung kleiner werden, was z.B. im Vorwärtsstreulicht der Durchflußzytometrie deutlich wird, und die Proteinmenge stärker als die PKC-Aktivität abnimmt (Ergebnisse nicht gezeigt), kann von einem Anstieg der "spezifischen" PKC-Aktivität pro Proteinmenge im Verlauf der Ausdifferenzierung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen ausgegangen werden, die jedoch nur ca. 60% der "spezifischen" Aktivität reifer Neutrophiler erreicht (Ergebnisse nicht gezeigt). DMSO-differenzierte HL-60 Zellen sind somit auch unter diesem Aspekt, neben z.B. der eingeschränkten Phagozytose-Aktivität, nicht mit reifen Granulozyten gleichzusetzen, was die Begründung für die ebenfalls verminderte "respiratory burst"-Reaktion der induzierten HL-60 Zellen liefern könnte (s. Kap. 3.1.3).

Die intrazelluläre Verteilung der in vitro erfaßbaren PKC-Aktivität kann von einer ca. 40% : 60%-Verteilung zwischen Zytosol (100.000 x g-Überstand) und Membranfraktion (100.000 x g-Pellet) im unstimulierten Zustand durch PMA-Behandlung - besonders bei HL-60 Zellen - in eine deutliche Anreicherung an der Membran durch die sog. "Translokation" der PKC umgewandelt werden. In der zytosolischen Fraktion werden dann nur noch Anteile von ca. 12% (bei Granulozyten jedoch noch ca. 50%) der gesamten erfaßbaren Aktivität bestimmt, womit ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Zelltypen deutlich wird. Diese Translokation, bei der eine starke Beteiligung des Zytoskeletts diskutiert wird (Nauseef et al. 1991), wird zumindest für die PMA/DAG-

abhängigen Isoenzyme als Voraussetzung für die volle Stimulierbarkeit der Enzymaktivität angesehen (Edwards 1994; Lord & Pongracz 1995).

Die mit dem angewandten Meßverfahren erfaßbaren PKC-Isoenzyme (s. Kap. 3.1.4) haben sich in unseren Bedingungen z.T. als strahlensensibel erwiesen. Die Effekte betreffen sowohl die PKC-Aktivität als auch das Translokationsvermögen der Enzyme. Beim Letzteren verursacht die Bestrahlung (1 Gy) undifferenzierter HL-60 Zellen mit sofortiger Aufarbeitung der Proben eine deutliche Steigerung des Anteils nicht translozierender Aktivität, d.h. Bestrahlung behindert die Translokation von PKC-Aktivität. Wenn dagegen die PKC-Messung an den Tagen 4 bis 6 nach Bestrahlung mit 1 Gy durchgeführt wird, ist die Translokation leicht stimuliert. Unmittelbar nach Bestrahlung reifer Granulozyten mit 5 Gy werden wiederum keine signifikanten Effekte auf die Translokationsfähigkeit gefunden. Die letztere Beobachtung bei HL-60 Zellen könnte mit der Beeinflussung des Zytoskeletts (vgl. Kap. 3.1.6 und 4.1.4) durch ionisierende Strahlung erklärt werden, wo persistent erhöhte F-Actin-Gehalte in bestrahlten Zellen effektivere "Gleise" für Translokation von PKC-Aktivität an die Plasmamembran bilden könnten. Vergleichbare Untersuchungen sind dazu aus der Literatur nicht bekannt.

Die Gesamt-PKC-Aktivität bestrahlter HL-60 Zellen verhält sich dagegen spiegelbildlich zum Translokationsvermögen der Enzymaktivität. Bei PMA-stimulierten undifferenzierten Zellen wird eine leichte akut strahleninduzierte Zunahme gemessen sowie eine Abnahme bei verzögerter Messung im Zeitraum 4 - 6 Tage nach Bestrahlung und DMSO-Induktion bzw. bei akut gemessenen Neutrophilen nach einer Dosis von 5 Gy.

Beide Beobachtungen - noch/bereits an die Membran translozierte und damit möglicherweise nicht (mehr) stimulierbare PKC-Aktivität sowie die reduzierte Gesamt-Aktivität - könnten für die verminderte "burst"-Reaktion PMA-stimulierter HL-60 Zellen im Zeitraum mehrere Tage nach Bestrahlung und Induktion zur Differenzierung (s.u. und Kaffenberger & van Beuningen 1994) verantwortlich sein.

Strahleneffekte auf der Ebene der PKC-Isoenzyme sind bereits zuvor beschrieben worden. Woloschak et al. (1990) berichteten einen strahleninduzierten (0,75 Gy Röntgenstrahlen) Anstieg der mRNA für PKC β mit einer ca. 5-fachen Erhöhung eine Stunde nach Bestrahlung von Fibroblasten, während Kim et al. (1992) auf Proteinebene die Induktion (11-fach) von PKC ϵ durch 1,5 Gy in manchen, jedoch nicht allen untersuchten Lungenkarzinom-Zelllinien beobachteten. Dieser letztere Anstieg geschah durch posttranslationale Regulation, da weder Protein- noch RNA-Synthese erforderlich waren (Kim et al. 1992). In einer neueren Arbeit berichten Hasan et al. (1996) über eine durch 0,75 oder 1,5 Gy induzierte vermehrte Expression von PKC α -Protein und dessen Aktivierung in V79 Zellen. Strahleninduzierte Veränderungen auf Proteinniveau wurden bei den von uns untersuchten PKC-Isoenzymen nicht gefunden.

Die Arbeiten aus der Weichselbaum-Gruppe beschäftigen sich schließlich mit Strahleneffekten auf der Ebene der Gesamt-Phosphotransferase-Aktivität auf ein PKC-spezifisches Peptidsubstrat (Hallahan et al. 1991, 1992 sowie 1994 und 1994b). Die Autoren leiten aus den beobachteten Effekten (z.B. Induktion des Transkriptionsfaktors *c-Jun*), die durch PKC-Inhibitoren (Staurosporin, H-7, etc.) blockierbar sind, ohne direkte PKC-Enzymbestimmung eine Beteiligung dieser Aktivität in Gesamtzellaufschlüssen ab (Hallahan et al. 1991 a und b, 1992a; Datta et al. 1992). Deren Ergebnisse belegen die äußerst transiente Induzierbarkeit einer erhöhten PKC-Aktivität, die jedoch aufgrund ihrer Kurzlebigkeit und im Gegensatz zu unseren Befunden nicht bei der auch von uns angewandten "Standard"-Dosisleistung (1 Gy/min) erfaßbar sein sollte, sondern nur nach Anwendung einer extrem hohen Dosisleistung (z.B. 2,7 Gy/sec; Hallahan et al. 1994b).

Der molekulare Mechanismus der PKC-Aktivierung nach Bestrahlung ist jedoch noch nicht identifiziert. Die Befunde von Schreck et al. (1991) sowie Mohan & Meltz (1994) weisen über die Aktivierbarkeit des Nuklearfaktors κB (NF- κB) durch PKC darauf hin, daß vermutlich reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sein werden, da der Effekt durch das Antioxidans N-Acetyl-L-Cystein inhibiert werden kann. Gemäß den Beobachtungen in bestrahlten B-Lymphozyten-Zelllinien (Uckun et al. 1993) könnten Phosphorylierungsschritte an Proteintyrosinresten dabei ebenfalls eine Rolle spielen (s. Kap. 4.2.3.1.4).

Die Beteiligung von PKC-Aktivität bei der Signaltransduktion zur Auslösung des "respiratory burst" wird aus der Stimulierbarkeit durch Phorbol ester und Inhibierbarkeit durch Kinase-Hemmer abgeleitet (Dewald et al. 1989; Thelen et al. 1993; Dagher et al. 1995). Da der Beginn der Reaktion nach PMA-Gabe jedoch leicht hinter der Kinetik einer Rezeptor-vermittelten Reaktion zurückbleibt (vgl. Abb. 26b), kann die Aktivierung von PKC-Isoenzymen allerdings nur einen Teil des Signaltransduktionsvorganges ausmachen (Wymann et al. 1987; Thelen et al. 1993).

Dementsprechend gelingt bei unseren Untersuchungen mit dem unspezifischeren Antagonisten von PK(C)-Aktivität Staurosporin (Tamaoki et al. 1986; Dewald et al. 1989; Meyer et al. 1989; Badwey et al. 1991; Budworth & Gescher 1995), der bereits alleine die Translokation von PKC-Aktivität an Membranen induzieren soll (Wolf & Baggiolini 1988), eine vollständige Blockade der Reaktion unter allen getesteten Stimulationsbedingungen. Der spezifischere PKC-Inhibitor H-7 (Hidaka et al. 1984), der ebenfalls wie Staurosporin mit ATP um die Bindungsstelle am Enzym konkurriert (Ding & Badwey 1993), verursacht Stimulus-abhängig nur eine ca. 50 - 80%ige Inhibition.

Daraus resultiert, daß die angewandten Stimuli auch Prozesse aktivieren könnten, die nicht H-7-sensitiv sind, und daß Signaltransduktionswege aktiviert werden, welche ohne PKC-Beteiligung auskommen (Billah et al. 1989; Garland 1992; Lu et al. 1993). Dieser Aspekt wird in der Literatur seit Jahren sehr kontrovers diskutiert (Della Bianca et al. 1986; Nath

et al. 1989; Twomey et al. 1990; Watson et al. 1991; Lund-Johansen & Olweus 1992; Goodman & Tenner 1992; Thelen et al. 1993; Kaffenberger & van Beuningen 1994).

In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Strahleneffekten auf PKC-Isoenzyme (Aktivität und Translokationsverhalten) werden nach PMA-Stimulation, jedoch nicht nach f-MLP-Aktivierung bestrahlter HL-60 Zellen sowohl beim NBT-Test als auch bei lumino- wie durchflußzytometrischer "burst"-Analyse entsprechende Inhibitionen der Reaktionen im Vergleich mit unbestrahlten Kontrollen beobachtet (Sendler et al. 1993; Kaffenberger & van Beuningen 1994 sowie Abb. 28).

4.2.3.1.1 Bedeutung der PtdIns-Phospholipasen C

Die durch Stimulation der Zellen mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen ausgelöste "respiratory burst"-Reaktion kann jedoch nicht alleine und auf direktem Weg, z.B. durch PKC-vermittelte Phosphorylierung von Oxidase-Komponenten (p47^{phox} oder p67^{phox}), verursacht werden. Es gibt zwar Hinweise, daß PKC β p47^{phox} phosphoryliert (Majumdar et al. 1993); dies kann jedoch von der zur Aktivierung der NADPH-Oxidase notwendigen Translokation des Proteins unterschieden werden, wofür u.a. "Lipid-2nd messenger" diskutiert werden (Dusi et al. 1993; Bastian & Hibbs 1994). Vielmehr ist PKC-Aktivität als einer von mehreren zusätzlichen Elementen der intrazellulären Signaltransduktion vorgeschalteter oder nachgestellter Bestandteil aufzufassen, der damit "upstream" oder "downstream" von diesen liegt. Dafür sprechen neben einer Vielzahl publizierter Ergebnisse (Reviews: Rossi 1986; Bellavite 1988; Lambeth 1988; Becker 1990; Rana & Hokin 1990; Segal & Abo 1993; Thelen et al. 1993; Bastian & Hibbs 1994; Cohen 1994) auch eine Reihe der im Rahmen dieser Untersuchungen erhobenen Befunde, welche ältere bestätigen, aber auch neue Ergebnisse hinzufügen und strahlensensitive Elemente identifizieren.

- 1) Inhibition der PtdIns-spezifischen PLC(β) mit dem Antagonisten U73122 verursacht nach PMA- oder f-MLP-Stimulation der Zellen ebenso eine völlige Blockade der "respiratory burst"-Reaktion wie die der zytoplasmatischen PLA₂-Aktivität durch Mepacrin/Quinacrin oder Pentoxifyllin.
- 2) Zu unterschiedlichen Anteilen inhibieren die stimulierte Reaktion auch Antagonisten von PtdCho-spezifischer PLC (D609), von PTK- (Genistein und Herbimycin A) und von PI3-K-Aktivität (Wortmannin in nM-Konzentrationen sowie LY294002).

Die klassische Signalübertragung sieht, ausgehend vom Rezeptor für Chemotaxine und durch heterotrimere G-Protein(e) vermittelt, die Aktivierung von PtdIns-PLC(β) als Effektormolekül vor. Deshalb ist es auch nicht überraschend, daß der f-MLP-induzierte "respiratory burst" durch einen als spezifisch für PtdIns-PLC-gekoppelte Prozesse angesehenen Inhibitor (U73122; Bleasdale et al. 1990; Yule & Williams 1992) unter unseren

Analysebedingungen völlig blockiert wird. Dieser Befund paßt zur Inhibition der Produktion von DAG und InsP_3 , der beobachteten Hemmung der Superoxidanionen-Produktion als Maß für "respiratory burst"-Aktivität in f-MLP-stimulierten Neutrophilen sowie zur Hemmung von PLC-Aktivität in isolierten Membranen (Bleasdale et al. 1990; Smith et al. 1990).

Obwohl U73122 auch in einer neueren Arbeit noch als spezifisch für (G-Protein-assoziierte) PtdIns-PLC angesehen wird (Sohn et al. 1995), bestehen daran angesichts der völligen Blockierbarkeit des PMA-induzierten "respiratory burst" der humanen Neutrophilen unserer Untersuchungen sowie in Alveolar-Makrophagen des Hundes (Dr. Beck-Speier, GSF München; persönliche Mitteilung) erhebliche Zweifel. Eine solche Spezifität würde PtdIns-PLC-Aktivität in einem Signaltransduktionspfad "downstream" von PKC-Isoenzymen, die durch PMA aktivierbar sind, plazieren. Dafür gibt es bisher keine Hinweise in der Literatur. Vielmehr muß für U73122 sowohl eine Wirkung auf PtdIns-PLC- als auch auf PLD-Aktivität ins Auge gefaßt werden (Gratas & Powis 1993), die z.B. in DMSO-behandelten HL-60 Zellen in der Lage ist, PMA- oder Pervanadat-induzierte PLD-Aktivität direkt zu inhibieren (Naccache et al. 1993) und bei der Wichtigkeit dieses Enzyms für die "respiratory burst"-Reaktion (s. Kap. 4.2.3.1.4) diese dadurch völlig zu blockieren. Angesichts seines nicht eindeutig definierten Targets müssen deshalb aufgrund unserer Daten Zweifel an der Tauglichkeit von U73122 als geeignetes antiproliferatives Agens (Powis et al. 1995) aufkommen.

Die Strahlenempfindlichkeit von (PtdIns)-PLC-Aktivität wurde nicht ausdrücklich, z.B. unter U73122-Gabe, geprüft; ihre relative Resistenz kann jedoch indirekt aus der nach f-MLP-Stimulation unbeeinflussten "respiratory burst"-Reaktion abgeleitet werden. Dies trifft sowohl für die mit 5 Gy akut bestrahlten Granulozyten (Abb. 25) als auch für die am Tag 0 mit 1 Gy bestrahlten HL-60 Zellen mit den nachfolgenden Messungen während des Zeitraums bis 7 d nach Induktion der Differenzierung zu (Kaffenberger & van Beuningen 1994).

4.2.3.1.3 Bedeutung der Phospholipase A_2 und von Arachidonsäure

Neben PtdIns-PLC-Aktivität werden auch die Phospholipasen D und A_2 als wichtig bei der Aktivierung von Phagozyten angesehen (Cockcroft 1992; Thelen et al. 1993; Thelen & Wirthmueller 1994; Exton 1994; Powis et al. 1995). Die PLA_2 -Aktivität betreffend ist die Situation durch das Nebeneinander von sekretorischer Enzymaktivität mit niedrigem Molekulargewicht (12-18 kDa; s PLA_2) und hochmolekularer (85-110 kDa) zytosolischer Form (c PLA_2) besonders komplex (Cockcroft 1992; Thelen et al. 1993; Thelen & Wirthmueller 1994). Beide Formen kommen in Neutrophilen/HL-60 Zellen vor und werden durch chemotaktische oder Phagozytose-auslösende Stimuli aktiviert (Cockcroft 1992; Ramesha & Ives 1993; Thelen et al. 1993; Thelen & Wirthmueller 1994). Allerdings soll aufgrund ihrer größeren Spezifität für Arachidonsäure (Clark et al. 1991; Piomelli

1993; Clark et al. 1995) aus Phospholipiden der inneren Schicht der Plasmamembran und damit ihrer intrazellulären Aktivität nur die cPLA₂ für die Signaltransduktion der Phagozyten von Bedeutung sein (Thelen & Wirthmueller 1994). Das Enzym enthält eine Ca²⁺/(Phospho)-Lipid-Bindungsdomäne ("CaLB"-Domäne; Clark et al. 1995), die homolog zur C2-Domäne der PLC γ , des GTPase-aktivierenden Proteins (GAP) und der Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoenzyme ist (Liscovitch 1992; Thelen & Wirthmueller 1994; Clark et al. 1995). Aus der Notwendigkeit zur Translokation der letzteren an Membranen (Plasma-, Kernmembran, endoplasmatisches Retikulum; Clark et al. 1995) für ihre maximale Aktivierbarkeit kann Ähnliches für die PLA₂ abgeleitet werden. Unter erhöhten intrazellulären freien Ca²⁺-Spiegeln, die physiologischerweise PtdIns-PLC-Aktivität voraussetzen (Thelen et al. 1993), und möglicherweise verstärkt durch den Einstrom extrazellulären Ca²⁺ (Rehfeldt et al. 1993), könnte sie dort unter Beteiligung der "CaLB"-Domäne (Clark et al. 1995) ihr Substrat finden und durch PKC und/oder G-Protein-vermittelt aktiviert werden (Cockcroft 1992; Liscovitch 1992; Clark et al. 1993 und 1995). Eine PKC-Beteiligung wird durch die beobachtete Hemmung der Phosphorylierung und Aktivierung der PLA₂ durch Staurosporin gestützt (Lin et al. 1992). Andererseits wurde auch die Unabhängigkeit der cPLA₂-Aktivierung von [Ca²⁺] (und PKC-Aktivität) postuliert (Currie et al. 1992), so daß in unserem System mit Ca²⁺-freiem PBS bei der PMA-Stimulation eine Aktivierung von PLA₂ ebenfalls denkbar ist, die durch die entsprechenden Inhibitoren (Pentoxifyllin oder Mepacrin) antagonisiert werden konnte und möglicherweise dadurch die "burst"-Reaktion verhinderte.

Pentoxifyllin wird seit Jahren zur Behandlung von Venenverschlußkrankheiten eingesetzt, da gezeigt werden konnte, daß es die Aggregation von Thrombozyten inhibiert und die Verformbarkeit von Erythrozyten steigert (Review: Samlaska & Winfield 1994; Oismüller et al. 1995). Nach Knochenmarktransplantation dient es zur Verhinderung des Transplantat-induzierten TNF- α -Anstiegs (Bianco et al. 1992) und auch bei Sepsis-Patienten möchte man diesen Hauptmediator vieler biologischer Effekte der Sepsis durch Pentoxifyllin-Gabe modulieren (Beutler & Cerami 1988; Sullivan et al. 1988; Oismüller et al. 1995). Die inhibitorische Wirkung des Medikamentes auf die Freisetzung von Superoxidanionen durch Neutrophile in vitro (Boogaerts et al. 1990; Novick et al. 1990) konnte durch Hallahan et al. (1994) plausibel auf eine Hemmung von PLA₂-Aktivität zurückgeführt werden (siehe Kap. 1.3 und 4.4).

Mepacrin wird (auch unter der Bezeichnung "Quinacrin") als Antimalariamittel eingesetzt (Pharmazeutische Stoffliste 1985). Auf zellulärem Niveau ist die Substanz schon seit längerer Zeit als Phospholipase-Antagonist bekannt (Erman et al. 1983). Die vermeintliche Spezifität des Mepacrins für PLA₂-Aktivität beruht auf der Hemmbarkeit der Freisetzung von Arachidonsäure (Erman et al. 1983; Maridonneau-Parini et al. 1986; Tsunawaki & Nathan 1986), die bevorzugt die sn-2-Position von Alkyl/Acyl-Glycerol-Verbindungen

besetzt (Clark et al. 1991; Lin et al. 1993; Khan et al. 1995), wobei eine indirekte, PLC-vermittelte Mepacrin-Wirkung auf PLA_2 -Aktivität möglicherweise übersehen wurde (Hofmann et al. 1982; Stasi et al. 1992). Dazu paßt auch der beschriebene Ca^{2+} -antagonisierende Effekt des Quinacrin (Filippov et al. 1989).

Hinsichtlich des Mepacrin-Effektes auf PMA-stimulierte Phagozyten existiert seit längerer Zeit ein Widerspruch. Während die Generierung von Superoxidanionen nach PMA-Stimulation humaner Neutrophiler durch "Mepacrin" nicht signifikant inhibiert war (Mari-donneau-Parini et al. 1986), zeigten μM -Konzentrationen von "Quinacrin" bei Peritonealmakrophagen der Maus eine deutliche Inhibition der H_2O_2 -Produktion nach PMA-Gabe (Tsunawaki & Nathan 1986). Unsere Befunde stützen mit jeweils praktisch totaler Inhibition sowohl des PMA- wie des f-MLP-induzierten "respiratory burst" von Neutrophilen nach Vorinkubation der Zellen mit einem der beiden Antagonisten, Mepacrin/Quinacrin oder Pentoxifyllin, die Beobachtungen anderer Autoren (Tsunawaki & Nathan 1986; Henderson et al. 1993; Dana et al. 1994) und plazieren damit die cPLA_2 -Aktivität in Phagozyten ebenfalls "downstream" von PMA-aktivierten PKC-Isoenzymen (Cockcroft 1992; Dana et al. 1994) bzw. von Chemotaxin/G-Protein/PLC/PKC-induzierten Prozessen. Als weitere Möglichkeit der Aktivierung von cPLA_2 ist ein "Pathway" zu diskutieren, der MAP-Kinase-Aktivität mit einbezieht (Lin et al. 1993; Clark et al. 1995). Die Expression von MAPK, auch "extrazelluläre Signal-regulierte Kinase" (ERK) genannt, ist in Neutrophilen belegt (Lu et al. 1993; Torres et al. 1993; Grinstein et al. 1994; Downey et al. 1995). Lin et al. (1993) konnten zeigen, daß cPLA_2 ein Substrat der MAPK darstellt, das durch MAPK an der Aminosäure Ser-505, angeblich wie in Phorbol-ester-stimulierten Zellen phosphoryliert wird, was in beiden Fällen zu einem Anstieg der PLA_2 -Aktivität führt (Lin et al. 1993). Dieser Ansicht widersprechen allerdings die Befunde von Nemenoff et al. (1993), die basierend auf "peptide mapping" unterschiedliche Phosphorylierungsmuster von MAPK und PKC an cPLA_2 beschreiben, und die Notwendigkeit einer gemeinsamen Aktion der beiden Kinasen zur maximalen Aktivierung der Phospholipase postulieren. Da auch MAPK ein Target für Phorbol-ester darstellt (Cobb et al. 1991; Posada & Cooper 1992), ist jedoch unabhängig von der zuvor geführten Diskussion somit die zweifache Möglichkeit der MAPK-Aktivierung, PKC-vermittelt und direkt, mit der daraus resultierenden PLA_2 -Aktivität gegeben (Lin et al. 1993). Für die direkte Aktivierung von MAPK gibt es Hinweise in der Literatur (Qiu & Leslie 1994), die G-Protein-vermittelt, z.B. nach Stimulation der Zellen mit f-MLP, potentiell über den "klassischen" "Ras"-Pathway der Mitogene (Khosravi-Far & Der 1994) zur Aktivierung von MAPK führen könnte (Torres et al. 1993; Worthen et al. 1994). Dagegen gibt es für eine direkte Interaktion von G-Protein(en) mit dem PLA_2 -Enzym, ähnlich der mit den β -Isoformen der PtdIns-PLC (Rhee & Choi 1992), bisher keine gesicherten Hinweise (Clark et al. 1995). Unser Modell der Aktivierung vom PLA_2 (Abb. 49) sieht deshalb eine f-MLP- oder PMA-vermittelte Aktivierung von MAPK als Effektormolekül für die Pentoxifyllin- oder

Mepacrin-inhibierbare PLA₂-Aktivität vor. Dabei kann möglicherweise ein fehlender Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration {[Ca²⁺]_i} nach PMA-Stimulation (Ozaki & Kume 1988) eine nicht-maximale PLA₂-Aktivität zur Folge haben.

Die zuvor beschriebene Situation wird aber noch dadurch verkompliziert, daß - wie kürzlich berichtet - die MAPK-Aktivität trotz aller beobachteten Koinzidenz völlig von der Auslösung des "respiratory burst" in Neutrophilen/HL-60 Zellen abgetrennt werden konnte (Yu et al. 1995). Diese Autoren stellen dementsprechend jeglichen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von MAPK und anderen zellulären Reaktionen der Granulozyten in Frage, was die dringende Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zu dieser Problematik deutlich macht.

Mit der Blockade von PLA₂-Aktivität und daraus resultierend der unterdrückten Freisetzung von Arachidonsäure (AA) ist aber die Hemmung des "respiratory burst" noch nicht hinreichend erklärt. Dazu bedarf es der Diskussion der Bedeutung von AA bei der Aktivierung von Neutrophilen. Als eine Hauptfunktion wird ihr Status als Vorläufermolekül zur Synthese potenter extrazellulärer Mediatoren, Prostaglandine und Leukotriene (Sammelbegriff: Eicosanoide), angesehen, die nicht nur Produkte von Neutrophilen darstellen, sondern auch potente Modulatoren von Neutrophilenaktivität (Piomelli 1993; Thelen et al. 1993), die hier jedoch nicht weiter diskutiert werden sollen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang allerdings noch, daß das therapeutische Potential dieser Substanzklasse der Eicosanoide als (selektive?) Radioprotektoren von Normalgewebe in letzter Zeit in der Radioonkologie eine gewisse Diskussion und Beachtung erfahren hat (Review: Milas & Hanson 1995).

Darüber hinaus muß AA als wichtiger intrazellulärer "2nd messenger" betrachtet werden (Cockcroft 1992; Piomelli 1993; Thelen et al. 1993; Khan et al. 1995). Die Aktivierung von PKC-Isoenzymen - besonders der α -Isoform (Sekiguchi et al. 1987; Nishizuka 1988) - durch AA wird kontrovers diskutiert, wobei die dabei notwendigen relativ hohen Konzentrationen (bis 1.000 μ M AA) als das größte Hindernis zur Akzeptanz von AA als physiologischer Aktivator angesehen werden (Henderson et al. 1993; Dana et al. 1994). Die PKC-Hauptform in Neutrophilen/HL-60 Zellen (PKC β ; Edwards 1994; unsere eigenen Ergebnisse, s. Abb. 19) reagiert dagegen relativ schlecht auf AA, während das als empfindlicher (10 μ M AA) eingestufte γ -Isoenzym bisher nur in Zellen des ZNS vorkommen soll (Nishizuka 1988; Shearman et al. 1989). Aktivität der cPLA₂ könnte also auf der Ebene des PKC-Isoenzyms α zu einer positiven Rückkopplung führen (Thelen et al. 1993), wobei die Signalweiterleitung zur NADPH-Oxidase jedoch noch ungeklärt bleibt. Während deren Aktivierung im "zellfreien" System durch AA seit längerer Zeit gut belegt ist (Curnutte 1985; McPhail et al. 1985), konnte die Situation in intakten Neutrophilen/HL-60 Zellen bisher nicht eindeutig geklärt werden (Cockcroft 1992; Thelen et al. 1993). Die hier

vorgestellten Ergebnisse belegen aber ebenso die Notwendigkeit einer funktionsfähigen (c)PLA₂ zur Aktivierung der Oxidase wie die von Dana et al. (1994), können jedoch die exakten Mechanismen des Signaltransduktionsvorganges nicht aufklären. Dana et al. (1994) diskutieren deswegen auch die Einbeziehung von sPLA₂-Aktivität zur Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion in einem Prozeß, der ohne PKC-Beteiligung auskommen soll. An der Bedeutung von Arachidonsäure für die Aktivierung der NADPH-Oxidase, wobei die freie Fettsäure als unmittelbarer Agonist des Enzyms in intakten Zellen anzusehen ist (Henderson et al. 1993), besteht allerdings kein Zweifel.

4.2.3.1.4 Bedeutung von Protein-Tyrosinkinasen, -Phosphatasen, Phospholipase D und Phosphatidylinositol 3-Kinase

Die mit den eingesetzten Stimuli ausgelöste "respiratory burst"-Reaktion in Neutrophilen/HL-60 Zellen kann über das zuvor Gesagte hinaus aber auch durch Inhibition von Protein-Tyrosinkinase-Aktivität moduliert werden. In unserem Modell hemmten Genistein oder Herbimycin A den biologischen Endpunkt zu ca. 80%. Da beide Antagonisten bisher als spezifisch für PTK angesehen werden (Akiyama et al. 1987; Fukazawa et al. 1991; Uehara & Fukazawa 1991; Uckun et al. 1993), muß aus den vorgestellten Daten eine Beteiligung von PTK-Aktivität bei der PMA- wie FPR-vermittelten "burst"-Reaktion postuliert werden. Besonders die f-MLP-induzierte Aktivierung von PTK ist trotz zahlreicher Belege (Berkow & Dodson 1990; Grinstein & Furuya 1990; Grinstein et al. 1990; Badwey et al. 1991; Bourgoin et al. 1992; Torres et al. 1993) bisher unverstanden. "Serpentine"-Rezeptoren besitzen keine endogene PTK-Aktivität und auch über eine mögliche Assoziation der intrazellulären Rezeptordomänen mit "Nicht-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen" (NR-PTK; s.u.) ist derzeit nichts bekannt (Thelen et al. 1993). Die Inhibition durch die beiden Antagonisten gelingt jedoch nicht vollständig; deshalb müssen weitere Signaltransduktionswege ohne PTK-Beteiligung zur "burst"-Aktivierung beitragen (s.u.). Das Ausmaß der Inhibition unter allen unseren getesteten Stimuli deckt sich jedoch mit publizierten Befunden nach Verwendung von Genistein (Azuma et al. 1993; Torres et al. 1993) oder Erbstatin als PTK-Antagonisten (Bourgoin et al. 1992).

Die Expression dieser Enzymaktivität aus der Familie der NR-PTK in hämatopoetischen Zellen ist publiziert (Bolen et al. 1992; Thelen et al. 1993; Thelen & Wirthmueller 1994; Downey et al. 1995) und wird von uns bestätigt (vgl. Abb. 34). NR-PTK-Aktivität wird allerdings bisher überwiegend im Zusammenhang mit der Signalübertragung zur Aktivierung von Zellen diskutiert, die durch Stimulation von Zytokin- oder Antigen-Rezeptoren ausgelöst wird (vgl. z.B. Khosravi-Far & Der 1994; Hunter 1995; Nakamura et al. 1996). Die Hauptvertreter an PTK in Phagozyten gehören der "src"-Familie der NR-PTK an (Bolen et al. 1992; Thelen & Wirthmueller 1994). Auch die hier vorgestellten "Western blot"-Daten belegen die konstitutive Präsenz von Proteinen aus der "src"-Familie in unseren Zellen, unter denen in Übereinstimmung mit der Literatur (Hamada et al. 1993;

Thelen et al. 1993; Perlmutter 1995) das Produkt des *c-fgr*-Protoonkogens (p55^{*c-fgr*}) näher identifiziert werden konnte (vgl. Abb. 34). Auf das Vorliegen möglicher weiterer NR-PTKs (p53/p56^{*lyn*}, p62^{*c-yes*}, p72^{*syk*}; *hck*; Agarwal et al. 1993; Corey et al. 1993; Durden et al. 1995) wurden unsere Zellen bisher nicht geprüft.

Da die Komponenten der NADPH-Oxidase (Cytochrom B-Formen, p47^{*phox*}, p67^{*phox*}, etc.) im Zuge der Enzymaktivierung nicht an Tyrosinresten phosphoryliert werden (Thelen et al. 1993), hängt die Initiation der "burst"-Aktivität offensichtlich nicht direkt von PTK ab. Dazu paßt auch unsere Beobachtung, daß alleine die Inhibition von Proteintyrosin-Phosphatasen (PTP) durch Vanadium-Verbindungen nicht zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase führt (s. Kap. 3.2.5.2; Steinbeck et al. 1991). Vielmehr ist die PTK-vermittelte Stimulation einer weiteren Phospholipase-Aktivität, PLD, mit der Bereitstellung eines weiteren Lipid-"2nd messengers" in Erwägung zu ziehen (Cockcroft 1992). PLD-Aktivität ist zudem als potentiell strahlensensibles Target anzusehen (Avila et al. 1993; s. Kap. 4.4). Deshalb wird ihre Regulation nachfolgend im Detail diskutiert.

Zumindest für Rezeptor-PTK- (EGF-, PDGF-R; Ben-Av & Liscovitch 1989; Fisher et al. 1991; Lee et al. 1994) und Antigen-Stimulation einer Zelllinie einer Basophilen-Leukämie der Ratte (Nakamura et al. 1996) ist die Aktivierung von PLD unmittelbar beschrieben. Auch für Neutrophile/HL-60 Zellen (Uings et al. 1992; Bourgoin & Grinstein 1992; Naccache et al. 1993) bzw. Fibroblasten (Briscoe et al. 1995) kann PTK-vermittelte PLD-Aktivität aus der Stimulierbarkeit von PLD alleine durch Inhibition von PTP mittels Vanadiumhydroperoxid ("Pervanadat") abgeleitet werden. Für Neutrophile wurde eine besonders hohe PTP-Aktivität berichtet, die durch "Pervanadat" hemmbar war (Grinstein et al. 1990).

In Einklang mit diesen Befunden haben unsere Ergebnisse in HL-60 Zellen eine ausgeprägte Zunahme der intrazellulären Fluoreszenzintensität nach Vorbehandlung der Zellen mit "Pervanadat" und nachfolgender Darstellung der Proteine mit Phosphotyrosin-Resten mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gezeigt. Dieser Effekt war durch Stimulation der Zellen mit f-MLP nur noch relativ gering zu steigern, was einerseits die grundsätzliche Phosphorylierbarkeit von Proteinen an Tyrosinresten durch G-Protein-vermittelte Signalübertragungsprozesse und andererseits aber auch die ungleiche Bedeutung der jeweiligen Beiträge (Inhibition von PTP-Aktivität bzw. zusätzlich induzierte Phosphorylierung von Tyrosinresten) für die Gesamt(tyrosin)phosphorylierung der Proteine verdeutlicht.

Eine solche Induzierbarkeit von Phosphorylierungen an Proteintyrosinresten durch praktisch alle relevanten Aktivatoren von Neutrophilen ist in der Literatur sehr gut belegt (Berkow & Dodson 1990; Grinstein et al. 1990; Garland 1992; Azuma et al. 1993; Fialkow et al. 1993; Lu et al. 1993; Mitsuyama et al. 1993).

Ebenfalls in Einklang mit publizierten Daten (Cui et al. 1994) beobachten wir eine deutlich um ca. 40% verstärkte "respiratory burst"-Reaktion in Ortho-Vanadat vorbehandelten Zellen nach f-MLP-Stimulation, während die PMA-induzierte Aktivität, ähnlich den Befunden von Lu et al. (1992) in etwa um den gleichen Betrag reduziert ist. Der Mechanismus des letzteren Effektes ist bisher nicht verstanden, belegt aber, daß bei gleichzeitiger Verstärkung der f-MLP-induzierten Reaktion durch Inhibition von Proteinphosphatasen (siehe dazu auch den nächsten Absatz) diese ohne nennenswerte PKC-Beteiligung ablaufen könnte (Lu et al. 1992). Mögliche Proteinkinasen als Alternativen zu PKC werden in der Literatur diskutiert (Ding & Badwey 1993 und 1993a).

Prinzipiell gleiche Befunde können wir nach Inhibition von Protein-Phosphatasen, die Serin-/Threoninreste dephosphorylieren, mittels Vorbehandlung der Zellen mit "Okadaic acid", einem Inhibitor, der bevorzugt den PP-Typ 2A antagonisiert (Lu et al. 1992; Djerdjouri et al. 1995), erheben. Hier wird die PMA-, ebenso wie die durch Immunkomplexe induzierte "burst"-Aktivität konzentrationsabhängig völlig inhibiert, während die f-MLP-stimulierte Reaktion in Anwesenheit von CytB um ca. 30% gesteigert wird. Ohne CytB im Ansatz verdreifacht sie sich sogar mit einem Konzentrationsoptimum bei 0,5 μM bis 1,0 μM "Okadaic acid" (vgl. Abb. 37). Sowohl unsere f-MLP- als auch unsere PMA-Daten bestätigen publizierte Befunde (Lu et al. 1992; Djerdjouri et al. 1994 und 1995) in humanen Neutrophilen. Sie können allerdings die biphasische - zunächst stimulierende, dann inhibierende - Aktion der OA, wie sie für die Stimulation von DMSO-differenzierten HL-60 Zellen mit opsoniertem Zymosan beschrieben ist (Suzuki et al. 1995), ebensowenig bestätigen, wie eine fehlende Wirkung auf den PMA-Stimulus bzw. die Inhibition des f-MLP-Stimulus (Okuyama et al. 1996). Während die erste Diskrepanz mit der Unterschiedlichkeit der angesprochenen Rezeptoren erklärt werden kann [opsoniertes Zymosan soll bevorzugt an den CD11b/CD18-Komplex binden (Goldstein et al. 1975), Immunkomplexe dagegen an Fc γ R (s. Kap. 4.2.3.2)], muß die zweite zu den Daten von Okuyama et al. (1995) bei der Ähnlichkeit der Konzentrationen der Stimuli (PMA bzw. f-MLP) offen bleiben. Unabhängig davon zeigt jedoch die Summe der Befunde die Bedeutung von PTP-im Zusammenspiel mit PTK-Aktivität bei der Regulation der "respiratory burst"-Oxidase und ist deshalb in das zusammenfassende Schema in Abb. 49 mitaufgenommen.

Der exakte Mechanismus der PLD-Aktivierung durch PTK und andere Prozesse ist allerdings nach wie vor unbekannt (Cockcroft 1992; McPhail et al. 1993; Thelen et al. 1993; Thelen & Wirthmueller 1994; Briscoe et al. 1995). Die mögliche Phosphorylierung des Enzyms betreffend, könnte er in Analogie zur Aktivitäts-induzierenden Phosphorylierung von PLC γ an Tyrosinresten (s. Kap. 4.2.3.2.3) in einem vergleichbaren Mechanismus bestehen oder in der Phosphorylierung eines konstitutiven PLD-Inhibitors, der dadurch inaktiviert wird (Bourgoin & Grinstein 1992). In einem postulierten Signaltrans-

duktionsweg nach PMA-, f-MLP- oder Immunkomplex-Stimulation der Zellen ist jedoch - unabhängig vom Aktivierungsmechanismus - die PLD-Aktivität distal zu PTK und beide auch distal zur PKC zu plazieren (Abb. 49). Dazu paßt auch, daß Kim et al. (1995) PDGF-induzierte PLD-Aktivität durch Herbimycin A-Vorbehandlung völlig und wir die "respiratory burst"-Reaktion unter allen Stimulationsbedingungen großteils durch die PTK-Inhibitoren Genistein oder Herbimycin A blockieren konnten (vgl. Abb. 35). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen mit anderen PTK-Inhibitoren (ST271, ST638, Erbstatin), die nicht in der Lage waren, Phorbol ester-aktivierte PLD in Neutrophilen zu hemmen (Uings et al. 1992). Der Widerspruch kann derzeit nicht aufgelöst werden und könnte mit einer Spezifität gewisser PTK-Inhibitoren für unterschiedliche NR-PTK zusammenhängen.

Neben dieser Möglichkeit der Aktivierung von PLD durch PTK wurden bereits von Reinhold et al. (1990) die weiteren Optionen der Stimulation von PLD-Aktivität durch PKC, durch Veränderung der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ und durch einen Wortmannin-hemmbar Weg aufgezeigt, die durch Pai et al. (1991) mittels Überexpression des β_1 -Isoenzym für die PKC-Alternative in PMA-stimulierten Fibroblasten bestätigt werden konnte. Im Gegensatz zu unseren "respiratory burst"-Befunden mit Wortmannin war jedoch bei Reinhold et al. (1990) der untersuchte biologische Endpunkt nach PMA-Stimulation, die Freisetzung von Phosphatidylethanol als direktes Maß für PLD-Aktivität, nicht durch den PI3-K-Antagonisten (teil-)inhibierbar. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz zwischen der Wortmannin-modulierbaren "burst"-Reaktion und der Unempfindlichkeit der PLD-Aktivität nach PMA-Gabe könnte die Beobachtung liefern, daß die Aktivierung von PLD durch PMA/PKC auch ATP-frei ohne Protein-Phosphorylierung möglich sein soll (Conricode et al. 1992), in einem Mechanismus, der bisher nicht geklärt ist und der die direkte Aktivierung von PLD durch Phorbol ester beinhalten könnte (Billah et al. 1989a; Liscovitch 1992).

Wie bei uns, konnte dagegen die f-MLP-induzierte "burst"-Reaktion in mehreren Arbeiten mittels Wortmannin völlig eliminiert werden (Reinhold et al. 1990; Bonser et al. 1991; Gélas et al. 1992; Arcaro & Wymann 1993; Stephens et al. 1993; Fry 1994; Okada et al. 1994). Aus der Summe der publizierten Daten kann eine direkte Kopplung eines heterotrimeren G-Proteins mit PI3-Kinase-Aktivität abgeleitet werden (vgl. Abb. 49), die von Stephens et al. (1994) als Interaktion des Enzyms mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit (UE) von G-Proteinen identifiziert werden konnte. Diese G-Protein-assoziierte PI3-Kinase ($p110\gamma$) ist nicht nur durch das Fehlen der regulatorischen p85-UE (vgl. Kap. 4.5.1) gekennzeichnet (Stoyanov et al. 1995; Zvelebil et al. 1996), sondern wurde durch unsere Arbeiten auch als strahlenempfindlich identifiziert (vgl. Abb. 41). Die Bestrahlung (5 Gy) von Granulozyten verstärkt nach f-MLP-, jedoch nicht nach PMA-Stimulation die inhibitorischen Effekte der

alleinigen Inkubation der Zellen mit den PI3-K-Antagonisten [niedrige Konzentrationen (< 50 nM) an Wortmannin oder 5 μ M LY294002].

Mit der katalytischen p110-UE der PI3-Kinasen ist mittlerweile auch das zelluläre Target für die pharmakologische Wirkung von Wortmannin oder LY294002 identifiziert (Arcaro & Wymann 1993; Yano et al. 1993; Powis et al. 1994; Thelen et al. 1994; Vlahos et al. 1994 und 1995; Nakanishi et al. 1995).

In einem f-MLP-stimulierten "Pathway" der Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase ist PI3-K-Aktivität gemäß den zuvor gemachten Ausführungen zweimal, sowohl "upstream" als auch "downstream" von PKC-Aktivität, einzutragen (vgl. Abb. 49). Dabei ist die exakte Position von PI3-K im "Pathway" "downstream" von PKC noch nicht eindeutig bestimmt. Untersuchungen an Osteoblasten-ähnlichen Zellen belegen, daß PI3-K-Aktivität in die Regulation von PLD durch PKC einbezogen ist und plazieren ihre Funktion "downstream" von PTK (Kozawa et al. 1995). Interessanterweise zeigen diese Autoren Daten, leider ohne sie zu diskutieren, die in Analogie zu unseren chemoluminometrischen Befunden (vgl. Abb. 42) die teilweise Aufhebung des starken inhibitorischen Effektes des Genisteins (30 μ g/ml) auf PLD-vermittelte Cholin-Freisetzung durch Wortmannin (1 μ M) belegen. Einschränkend muß allerdings zur Studie von Kozawa et al. (1995) erwähnt werden, daß Wortmannin in Konzentrationen bis 10 μ M eingesetzt wurde, ein Bereich, in dem die Spezifität von Wortmannin für PI3-K angezweifelt wird (Powis et al. 1994) und bei der auch die direkte Inhibition von PLD- (Bonser et al. 1991), von PKC- (Yano et al. 1993) und von PLA₂-Aktivität (Cross et al. 1995) diskutiert wurde.

Die Anordnung von PI3-K in einem Signaltransduktionsweg "downstream" von PTK ist jedoch nicht unumstritten. Die Befunde von Naccache et al. (1993) in humanen Neutrophilen/HL-60 Zellen sprechen für die Positionierung von PI3-K-Aktivität vor PTK ("upstream" von PTK), da die Autoren zeigen konnten, daß Wortmannin die Phosphorylierung an Tyrosinresten verschiedener Proteine nach Stimulation der Zellen mit löslichen wie partikulären Agonisten inhibiert, ein Vorgang, der unabhängig von PLD-Aktivität erfolgen konnte. Dabei blieb offen, ob das Enzym selbst oder weitere Faktoren, die zu seiner maximalen Aktivierung notwendig sind, Tyrosin-phosphoryliert werden (Naccache et al. 1993). Ein möglicher weiterer Faktor wurde inzwischen mit den ADP-Ribosylationsfaktoren (ARF) aus der Gruppe der "kleinen GTP-bindenden Proteine" identifiziert (Brown et al. 1993; Cockcroft et al. 1994; Quinn 1995), wobei neueste Untersuchungen darauf hindeuten, daß auch sie zur maximalen Aktivierung von PLD mit einem weiteren, unbekannten Faktor synergistisch kooperieren müssen (Quinn 1995 sowie weitere dort zitierte Literatur). In diesem Zusammenhang ist auch die berichtete Notwendigkeit eines aktiven PtdInsP₂-Metabolismus von Interesse, der unter Bildung von Phosphatitsäure (PA) und PtdInsP₂ durch PLD bzw. PtdIns-4-Phosphat-5-Kinase in einer positiven

Rückkopplung mit PtdInsP_2 als Kofaktor von PLD aus Membranen des Rattenhirns zu deren maximalen Aktivierung führen soll (Liscovitch et al. 1994).

PLD-Aktivität benutzt Phosphatidylcholin (PtdCho) als Substrat und setzt daraus neben Cholin sowohl Diacyl- als auch 1-Alkyl, 2-Acyl-PA frei (Agwu et al. 1989; Billah et al. 1989a; Cockcroft 1992; Meshulam et al. 1995). Eine Selektivität von PLD für PtdCho einer besonderen molekularen Spezies, die an der sn-1-Position eine gesättigte Fettsäure (18:0) tragen, ist allerdings kürzlich gerade für HL-60 Zellen, die mit Retinsäure zu Granulozyten differenziert wurden, gezeigt worden (Heung & Postle 1995). Die exakte Analyse der Lipase ist enorm erschwert durch das Fehlen eines spezifischen Inhibitors für PLD-Aktivität (Powis et al. 1995) und dadurch, daß das Enzym bisher weder in gereinigter Form vorliegt noch das PLD-Gen kloniert oder sequenziert ist (Cockcroft 1992; Liscovitch 1992; McPhail et al. 1993; Exton 1994). Aus der Vielzahl der vorliegenden Daten kann jedoch geschlossen werden, daß der größere Anteil an DAG in entsprechend stimulierten Zellen aus der Metabolisierung von PtdCho durch PLD-Aktivität stammt (Liscovitch 1992). Besonders nach Rezeptorstimulation wird z.B. in der Chemolumineszenz-Analyse des "respiratory burst" ein biphasischer Verlauf beobachtet (vgl. Abb. 26b), wobei der erste, schnell ansteigende und wieder abfallende Gipfel mit der Aktivität von PtdIns-PLC und deren Produkten (DAG , $\text{InsP}_3 \rightarrow \rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_i$) korreliert, während der länger andauernde zweite Gipfel von der Verstoffwechselung von PtdCho durch PLD herrühren soll (Billah & Anthes 1990; Cockcroft 1992; Liscovitch 1992; Exton 1994).

Für die Bereitstellung von DAG kommt grundsätzlich neben der PLD- auch PtdCho-PLC -Aktivität in Betracht. Beide liefern auf indirektem [über Phosphatidyl-Phosphohydrolase (PPH)-Aktivität] oder auf direktem Weg auch DAG als wichtigen Lipid-"2nd messenger".

An dieser Stelle soll nachdrücklich darauf hingewiesen werden, daß die Bezeichnungen DAG und PA jeweils für Stoffgruppen stehen, die aufgrund ihrer Herkunft aus PtdCho oder PtdIns oder Ptd-Ethanolamin eine sehr unterschiedliche molekulare Zusammensetzungen haben (Heung & Postle 1995) und sich in der HPLC-Analyse (vgl. Abb. 46) auch nicht als homogene Verteilung darstellen. Im Falle der DAGs wird z.B. eine Spezifität bei der Aktivierung verschiedener Isoformen der PKC diskutiert, wobei nur PtdIns-Metabolite , jedoch nicht $\text{PtdCho-Abkömmlinge}$ PKC-Isoenzyme aktivieren sollen (Leach et al. 1991) und auch die Heterogenität der PAs soll sich in unterschiedlichen biologischen Aufgaben ausdrücken (Bursten et al. 1994).

4.2.3.1.5 Bedeutung von Phosphatidyl-Phosphohydrolase

Die durch PLD-Aktivität erzeugte PA kann durch eine PPH zu DAG dephosphoryliert werden kann (Billah et al. 1989; Billah & Anthes 1990; Liscovitch 1992; McPhail et al. 1993; Meshulam et al. 1995), womit eine alternative Quelle der Bereitstellung dieses "2nd messengers" aufgezeigt ist, oder als PA eine eigenständige Funktion als "2nd messenger" erfüllen (s.u.). Die Bedeutung von PLD-Aktivität für die Generierung bzw. die Unterhaltung einer lang andauernden "respiratory burst"-Reaktion wird seit einigen Jahren intensiv bearbeitet, ohne daß hinsichtlich der Wichtigkeit der PLD ein Konsens erzielt werden konnte. In diesem Kontext wird allerdings weniger die Bedeutung der DAG-Bereitstellung als die der vorausgehenden PA-Produktion diskutiert, die von manchen Autoren als entscheidend beim "respiratory burst" angesehen wird (Pai et al. 1988; Agwu et al. 1989 und 1989a; Billah et al. 1989 und 1989a; Bonser et al. 1989 und 1991; Reinhold et al. 1990; Rossi et al. 1990; Agwu et al. 1991; Cockcroft 1992; Mullman et al. 1993).

Die Bedeutung der PA als Lipid-"2nd messenger" für die Aktivierung des f-MLP-induzierten "burst" konnte bei unseren Untersuchungen mit einer 8-fachen Zunahme der Reaktion in Neutrophilen und der erheblichen Steigerung in HL-60 Zellen durch Vorbehandlung der Zellen mit Propranolol in Übereinstimmung mit der Literatur (Bonser et al. 1989; Rossi et al. 1990; Agwu et al. 1991; Gay & Murray 1991; McPhail et al. 1993; Meshulam et al. 1995) deutlich belegt werden. Da in Propranolol-behandelten Zellen PA nicht durch PPH metabolisiert werden kann, steht es länger für die Aktivierung der NADPH-Oxidase zur Verfügung. Deren verstärkte Funktionalität wird als Argument für die direkte "2nd messenger"-Rolle der PA benutzt (Rossi et al. 1990; Agwu et al. 1991; Gay & Murray 1991; Sozzani et al. 1992).

Durch Propranolol verminderte Zellfunktion, wie der PMA-induzierte "burst" bei unseren Untersuchungen, wird dagegen als Argument für die Wichtigkeit der dadurch verminderten DAGs aus PLD/PPH-Aktivität verwandt (English & Taylor 1991; Gay & Murray 1991; Sozzani et al. 1992). Diese Argumentationslinien sind jedoch nur bedingt stichhaltig, da Hinweise vorhanden sind, daß hohe Konzentrationen an Propranolol (> 150 µM) direkt PLD-Aktivität (Gay & Murray 1991) bzw. auch PKC-Isoenzyme (α und β) mit einer IC₅₀ von ca. 150 µM inhibieren können (Sozzani et al. 1992), was die Interpretation der Daten sehr schwer macht. Unsere oben diskutierten Ergebnisse beziehen sich jedoch auf eine Konzentration von 50 µM Propranolol, bei der die Bindung eines radioaktiv-markierten Phorbolesters an Neutrophile um ca. 20% und deren Gesamt-PKC-Aktivität nur unwesentlich um ca. 10% reduziert waren (Sozzani et al. 1992). Deshalb kann unter unseren Meßbedingungen weiterhin von differenzierten Effekten des Antagonisten auf Rezeptor-vermittelte und -unabhängige Stimuli in Neutrophilen/HL-60 Zellen ausgegangen werden (Gay & Murray 1991). Eine PPH-kontrollierte Balance zwischen dem PLD-Produkt PA einerseits und der DAG-Konzentration andererseits, könnte in einem komplexen

Zusammenspiel mit AA (unsere Ergebnisse) sich als entscheidend für die zelluläre Reaktion (verstärkter/verminderter "burst") herausstellen (English & Taylor 1991; Gay & Murray 1991; Meshulam et al. 1995).

In Vergrößerung der Komplexität der Regulation der Superoxidanionen-Produktion findet zudem ein "cross-talk" zwischen zwei Phospholipasen statt, da das PLD-Produkt PA zusätzliche PLA₂-Aktivität induzieren soll (zitiert nach Bonser et al. 1991).

4.2.3.1.6 Bedeutung von Diacylglycerin-Kinase

Die oben angesprochene Balance zwischen PA und DAG wird aber nicht alleine von PPH-Aktivität, sondern auch von DAG-phosphorylierender DAG-Kinase-Aktivität bestimmt (English & Taylor 1991; Cohen 1994), deren Inhibition durch den Antagonisten R59 022 (de Chaffoy de Courcelles et al. 1985; Tuominen et al. 1994; Meshulam et al. 1995) zu einer DAG-Akkumulation führt. DAG-K transloziert - offensichtlich Substrat-reguliert - ebenso wie PKC-Aktivität aus dem Zytosol an die Plasmamembran. Diese Translokation erfolgt nach der Anreicherung der Kinase mit DAG, das von unterschiedlichen PKC-abhängigen Prozessen einschließlich der Stimulation der Zellen mit PMA herrührt, ohne jedoch von PMA direkt beeinflussbar zu sein (Maroney & Macara 1989). Das Enzym DAG-K soll in bis zu 6 Isoformen vorkommen (Maroney & Macara 1989), von denen bisher zwei in HL-60 Zellen nachgewiesen wurden und unter denen jedoch nur eine Form durch R59 022 hemmbar sein soll (Younes et al. 1992). Diese Autoren konnten darüber hinaus zeigen, daß ein weiterer vermuteter Lipid-"2nd messenger", das Sphingomyelinase-Produkt Ceramid (Spence 1993; Hannun 1994), als physiologischer Inhibitor von DAG-K fungieren könnte.

Unsere Ergebnisse belegen mit bis zu dreifach verstärkter "respiratory burst"-Reaktion durch Inhibition der Metabolisierung der DAGs durch DAG-K mittels R59 022 die Wichtigkeit des Lipid-"2nd messengers" für diese Immunfunktion der Neutrophilen/HL-60 Zellen. Sie bestätigen damit ähnliche Befunde nach f-MLP- oder PMA-Stimulation von Neutrophilen (de Chaffoy de Courcelles et al. 1985; Meshulam et al. 1995), weichen jedoch für differenzierte HL-60 Zellen mit der deutlichen Verstärkung der Reaktion auf PMA bei Vorbehandlung der Zellen mit R59 022 von den Beobachtungen in den reifen Zellen ab. Vergleichbare Untersuchungen mit HL-60 Zellen sind aus der Literatur nicht bekannt. Sie zeigen jedoch, daß PMA-Stimulation von differenzierten HL-60 Zellen offensichtlich DAG freisetzt (Bonser et al. 1991), dessen verhinderte Metabolisierung zu PA mit der verstärkten Produktion des O₂⁻ positiv korreliert. In der Literatur diskutierte DAG-Freisetzung durch PMA wird allerdings als von induzierter PLD-Aktivität herrührende PA mit deren Dephosphorylierung zu DAG angesehen (Reinhold et al. 1990; Bonser et al. 1991; Conricode et al. 1992; Exton 1994), worauf Inhibition der DAG-K keinen Einfluß haben sollte. PMA-stimulierte PKC-Aktivität hat jedoch eher einen negativen "feed back"-Einfluß auf PLC(β)-Aktivität als alternative Quelle für DAG (Della Bianca et al. 1986;

Smith et al. 1987; Tyagi et al. 1988), indem die Kopplung des aktivierten G-Proteins mit PtdIns-PLC beeinträchtigt sein soll (Mullmann et al. 1993). Unter den gegebenen Umständen muß deshalb eine *de novo* DAG-Synthese, wie sie auch für durch *Candida*-Hyphen ausgelöste Neutrophilen-Aktivierung diskutiert wird (Meshulam et al. 1995), als Erklärungsversuch ins Auge gefaßt werden.

4.2.3.1.7 Bedeutung von PtdCho-Phospholipase C

Basierend auf der Verwendung eines bisher als spezifisch angesehenen Inhibitors für PtdCho-PLC-Enzymaktivität (D609; Schütze et al. 1992; Wiegmann et al. 1994; Schütze et al. 1994), erbringen unsere Ergebnisse einen starken Hinweis auf das Vorhandensein von PtdCho-PLC auch in Neutrophilen. Besonders im Zusammenhang mit der Signalübertragung, die durch die Bindung von Zytokinen an ihre Rezeptoren ausgelöst wird, wird die Beteiligung von PtdCho-PLC in einer Vielzahl von Zelltypen, darunter auch Neutrophile und HL-60 Zellen, beschrieben (Review: Schütze et al. 1994 und dort zitierte Literatur). Billah et al. (1989) und Cockcroft (1992) bzw. Chabot et al. (1992) dagegen glauben zumindest für eine f-MLP-induzierte bzw. eine f-MLP- oder PMA-induzierte PtdCho-PLC-Aktivität keinen Hinweis erhalten zu haben. Eine direkte Beteiligung von PtdCho-PLC bei der Stimulation der "respiratory burst"-Oxidase in Neutrophilen ist bisher nicht belegt. Die Interpretation von Experimenten, bei denen durch die Inkubation von Zellen mit einem Antagonisten der alleinige Nachweis einer Enzymaktivität geführt wird, ist sicherlich problematisch. Sie könnte im Falle von D609 angesichts zweifelhafter Spezifität (Gratas & Powis 1993; die Autoren diskutieren eine D609-Wirkung auf PLD-Aktivität mit einer IC_{50} -Konzentration von 820 μ M, haben dabei jedoch bisher noch keinen Widerhall in neuerer Literatur gefunden) zu falschen Schlußfolgerungen führen. Die nur partielle Hemmbarkeit sowohl der Phorbol ester- wie der Rezeptoragonisten-vermittelten Reaktionen - trotz der relativ hohen Konzentration (50 μ g/ml = 187 μ M) an Inhibitor D609 - deutet auf die Möglichkeit von "bypasses" der Signalweiterleitung hin, die offensichtlich nicht D609-empfindlich sind und möglicherweise von einer durch die angewandte Konzentration nicht völlig inhibierten PLD-Aktivität herrühren könnte.

In diesem Kontext ergibt sich eine interessante Möglichkeit der Aktivierung von MAPK, die in NIH (M17) Zellen beschrieben wurde (Cai et al. 1993) und die auch auf stimulierte Granulozyten zutreffen könnte. Cai et al. (1993) belegen die Aktivierbarkeit von Raf-1-Kinase durch PtdCho-PLC-vermittelte Hydrolyse von PtdCho und eröffnen damit potentiell einen weiteren Weg zur Stimulation von MAPK-Aktivität. Inwieweit er tatsächlich in Neutrophilen beschränkt wird und dabei evtl. zur Aktivierung von PLA₂ führt (s. Kap. 4.2.3.1), bedarf der exakten Überprüfung. Befunde von Büscher et al. (1995) in Makrophagen-Zelllinien deuten jedoch bereits darauf hin, daß die Situation offensichtlich noch komplexer ist, und daß zur tatsächlichen MAPK-Aktivierung vermutlich ein zweites

Signal notwendig ist, da PKC-Stimulation der Zellen zwar zur Aktivierung der Raf-1-Kinase, jedoch nicht der MAPK führte. Eine Publikation aus jüngster Zeit (Bjørkøy et al. 1995) könnte mit PKC ζ - neben aus PtdCho generiertem DAG - das notwendige zweite Signal dieses mitogenen "Pathways" in NIH 3T3 Fibroblasten identifiziert haben. PKC ζ -Protein konnte in unseren Zelltypen bisher jedoch nicht detektiert werden. Die Notwendigkeit des Eingangs mehrerer Signale über verschiedene Transduktionswege zur vollen Aktivierung der MAPK, von denen eines PKC-abhängig ist, wurde darüber hinaus bereits in einer weiteren Untersuchung gefordert (Schiemann & Nathanson 1994).

Die Bedeutung von PtdCho-PLC-Aktivität für die Regulation eines weiteren, immunologisch wichtigen Enzyms, das zudem eine gewisse Verwandtschaft mit NADPH-Oxidase aufweist (Bastian & Hibbs 1994), der Stickoxid-Synthase, ist kürzlich in LPS- oder IFN- γ -aktivierten Makrophagen gezeigt worden (Sands et al. 1994). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Abklärung des Beitrags der vermuteten PtdCho-PLC bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion der Neutrophilen. Angesichts der Unsicherheit dieses Beitrags (Spezifität des Inhibitors, PtdCho-PLC-Gen nicht kloniert, etc.) findet diese Aktivität jedoch keine Aufnahme in das zusammenfassende Schema der Aktivierung der "burst"-Oxidase (Abb. 49).

4.2.3.2 Fc γ -Rezeptor-induzierte Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase

4.2.3.2.1 Signaltransduktion durch Fc γ -Rezeptoren

Die Rezeptoren (R) für den konstanten Teil (Fc) der Immunglobuline (Ig) der Klasse G (Fc γ R) gehören zur Familie der Immunglobulin-Supergene (Ravetch 1994). Von den 8 im menschlichen Genom identifizierten Fc γ R-Genen [je drei (A, B und C) für die RI und -II sowie zwei (A und B) des RIII] werden in Neutrophilen-(ähnlichen) Zellen (Neutrophile, HL-60 und U937 Zellen) alle Formen mit Ausnahme des Fc γ RIIIA exprimiert, der eine Besonderheit von natürlichen Killerzellen und Makrophagen darstellt (Lin et al. 1994; Ravetch 1994; Roitt et al. 1995). Die molekularen Strukturen der einzelnen R-Typen sind aufgeklärt und zeigen für die Fc γ RI und -II der Neutrophilen jeweils das Vorhandensein transmembranöser Domänen, im Falle des Fc γ RIIIB - als Besonderheit in Neutrophilen - jedoch nur eine Verankerung der immunologisch einheitlichen extrazellulären Domänen über eine Glykosylphosphatidylinositol-Gruppe in der Plasmamembran, ohne jegliche transmembranöse oder zytoplasmatische Proteinkomponente (Hogg 1988; Hundt & Schmidt 1992 und 1992a; Lin et al. 1994; Ravetch 1994).

Die Signalübertragung zur Auslösung zellulärer Reaktionen nach Ligandenbindung an Fc γ R, die in der Immunphänotypisierung als CD64, CD32 und CD16 (Fc γ RI - III) bezeichnet

werden (s. Kap. 3.1.2) ist bisher nur unzureichend aufgeklärt (Cambier 1995; Greenberg 1995; Kobayashi et al. 1995). Dies gilt besonders nach Stimulation der Zellen mit Immunkomplexen (Kobayashi et al. 1995), denen eine große pathophysiologische Bedeutung im Entzündungsgeschehen und der damit einhergehenden Gewebsschädigung beigemessen wird (Weiss 1989). Im Gegensatz zu vielen R für Wachstumsfaktoren und andere Zytokine, genügt hier nicht die Bindung des (spezifischen) Liganden an Fc γ R zur Stimulation einer intrazellulären Antwort; vielmehr ist eine Quervernetzung ("cross-linking") oder Immobilisierung mehrerer (verschiedener) Fc γ R in der Plasmamembran, wie sie z.B. durch polyvalente Immunkomplexe bewerkstelligt wird, zur Aktivitätsauslösung notwendig (Lin et al. 1994). Der Nachteil einer solchen Zellaktivierung mit unlöslichen Immunkomplexen besteht in der Unmöglichkeit den individuellen Beitrag einzelner Fc γ R-Typen zur gemessenen Gesamtreaktion abzugrenzen, wenn - wie in unserem Fall (vgl. Kap. 3.1.2) - alle Fc γ R-Formen auf HL-60 Zellen und Neutrophilen gleichzeitig exprimiert werden. Andererseits zeigen Untersuchungen von Brunkhorst et al. (1992), daß beide Rezeptortypen, Fc γ RII und -III, für die volle ("burst"-)Aktivierung der Zellen unbedingt notwendig sind. Die spezifische Rolle des Fc γ RIII ohne zytoplasmatische Domäne ist dabei umstritten (Huizinga et al. 1989; Crockett-Torabi & Fantone 1990; Brunkhorst et al. 1992; Lin et al. 1994; Ravetch 1994). Möglicherweise kommt ihm die Rolle eines "Auffangbeckens" zu, das zunächst die lokale Konzentration an Immunkomplexen auf der Zelloberfläche erhöht, um dann bei erreichter Konzentrationsschwelle in einem Synergismus mit Fc γ RII die Reaktion auszulösen (Ravetch 1994). Andere Autoren (Hundt & Schmidt 1992 und 1992a; Edberg & Kimberly 1994; Hoffmeyer et al. 1995) diskutieren dagegen den Fc γ RIII als einen eigenständigen, voll funktionsfähigen Rezeptor, der z.B. die Induktion des "respiratory burst" effektiver ausüben soll als der Fc γ RII. Dieser Widerspruch kann durch unsere Untersuchungen bisher nicht aufgelöst werden.

Alle Fc γ R besitzen darüber hinaus keine endogene Proteindomäne mit PTK-Aktivität, sondern sind mit einer zytoplasmatischen Struktur ausgezeichnet, die auch bei den Antigen-Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten gefunden wird, und als "immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)" bezeichnet wird (Cambier 1995). Sie beziehen sich alle auf eine Proteinsequenz mit großen Homologien zwischen verschiedenen Immunrezeptor-Typen, die durch zwei Tyrosinreste charakterisiert sind, und die als Interaktionsorte für zytosolische (NR)-PTK mit den Fc γ RI und -II identifiziert wurden (Cambier 1995; Greenberg 1995). Diese Assoziation zwischen dem "ITAM"-Motiv und PTK nach Fc γ R-"cross-linking" mit der nachfolgenden "Transphosphorylierung" der Tyrosin-Reste der "ITAMs" wird als das primäre Ereignis der Signaltransduktion nach Fc γ R-Stimulation angesehen (Lin et al. 1994; Cambier 1995). Danach soll durch Umorientierung der *src*-PTK die Möglichkeit der Interaktion der phosphorylierten Tyrosine mit anderen

Effektorproteinen (z.B. PLC γ_1 und PI3-K; s. Kap. 4.2.3.2.3) geschaffen werden (Cambier 1995).

4.2.3.2.2 Bedeutung von Protein-Tyrosinkinasen und Phospholipase A₂

Entsprechend dieser Modellvorstellung führte eine Genistein-Behandlung unserer Zellen vor Stimulation mit Immunkomplexen in Übereinstimmung mit früheren Befunden (Della Bianca et al. 1993) zu einer massiven Inhibition unseres chemoluminometrisch gemessenen Endpunktes. Daraus muß die Beteiligung von PTK bei der Immunkomplex/Fc γ R-vermittelten "burst"-Reaktion in Übereinstimmung mit publizierten Befunden (Hundt & Schmidt 1992a; Durden & Liu 1994; Durden et al. 1994; Hoffmeyer et al. 1995) abgeleitet werden. Im speziellen Fall der Aktivierung des Fc γ RI werden auch Ser/Thr-Kinasen diskutiert (Durden et al. 1994a). Die dafür potentiell in Frage kommenden Kinasen wurden in unseren Neutrophilen/HL-60 Zellen als der Gruppe der *src*-Kinasen angehörig, mit der Einengung auf *fgr* identifiziert (s.o.). Ohne Messung eines biologisch/klinisch relevanten Endpunktes haben Hamada et al. (1993) sowie Agarwal et al. (1993) berichtet, daß in Neutrophilen der Fc γ RII mit *fgr*-PTK assoziiert ist und mit ihm kopräzipitiert werden kann, während in HL-60 Zellen nach Stimulation der Fc γ RI oder -II die PTK p72^{syk} als Substrat identifiziert werden konnte. In IFN- γ -induzierten U937 Zellen wurde schließlich neben p72^{syk} (Durden et al. 1994) durch "cross-linking" des Fc γ RI mit geeigneten Antikörpern zusätzlich die Beteiligung der NR-PTK *hck* und der MAPK bei der Auslösung der "respiratory burst"-Reaktion gezeigt (Durden et al. 1995). Über die weiteren Prozesse zur Aktivierung der NADPH-Oxidase konnte in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, insbesondere blieb die Option der MAPK-aktivierten PLA₂ (Lin et al. 1993; s. Kap. 4.2.3.1.3) als Auslöser der "burst"-Reaktion gänzlich unerwähnt.

Eine solche PLA₂-Aktivität nach Fc γ R-Stimulation/Phagozytose muß allerdings ernsthaft in Erwägung gezogen werden. Dafür sprechen neben unseren Befunden mit Immunkomplexen nach PKC-Blockade in Neutrophilen mit H-7 (vgl. Abb. 27) bzw. nach PLA₂-Blockade mit Mepacrin oder Pentoxifyllin (Ergebnisse nicht gezeigt) auch die in humanen Monozyten (Karimi & Lennartz 1995). Während in unseren Untersuchungen beide Inhibitoren die durch Immunkomplexe ausgelöste NADPH-Oxidase-Aktivität stark antagonisieren konnten, waren Karimi & Lennartz (1995) in der Lage, durch Inhibition von PKC-Aktivität durch Staurosporin und Calphostin C sowohl die Phagozytose IgG-opsonierter Erythrozyten wie die Freisetzung von Arachidonsäure zu unterdrücken, die von einer Ca-unabhängigen PLA₂-Aktivität ("phagozytische" pPL) stammen soll. Aus der Gesamtbetrachtung dieser Ergebnisse läßt sich ein Signaltransduktions-"Pathway" ableiten, der ausgehend von Fc γ R-Stimulation/Phagozytose über PKC und MAPK (s.o.) zur (c/p)PLA₂-Aktivität führen könnte (Karimi & Lennartz 1995; unsere eigenen Ergebnisse).

4.2.3.2.3 Bedeutung von Proteinkinasen C, Phospholipase C und Phosphatidylinositol 3-Kinase

Damit ist die Notwendigkeit gegeben, die Möglichkeit der Aktivierung von PKC nach FcγR-Stimulation aufzuzeigen. Hinweise dafür liefern die Untersuchungen von Kobayashi et al. (1995), die nach FcγR-Stimulation mit einem Immunkomplex aus Tetanus-Toxoid/humanem anti-Tetanus-Toxoid-IgG-Antikörper in Neutrophilen einen Genistein-inhibierbaren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ aufzeigen konnten, die mit inhibierter Phagozytose einherging. Dieses Ergebnis sowie die Beobachtung, daß eine PtdIns-abhängige PLCγ₁ in U937 Zellen nach deren FcγR-Stimulation phosphoryliert und dabei aktiviert wird (Liao et al. 1992), zeigen einen Weg der Stimulation von PKC über PTK-abhängige PLCγ₁-Aktivität mit der Freisetzung von DAG und Ca²⁺ in diesen Zellen auf. Unsere eigenen Daten mit Immunkomplexen nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Antagonisten U73122 trugen mit einer ca. 50%igen Reduktion der "burst"-Reaktion zur Erhärtung dieser Befunde bei, können jedoch aufgrund der oben geführten Diskussion um die Spezifität der Substanz keinen endgültigen Beweis liefern. Auf diesem PLC-abhängigen Weg werden aber nur die DAG/Ca²⁺-abhängigen PKC-Isoenzyme der "klassischen" und "neuen" Gruppen (Lord & Pongracz 1995) aktiviert werden. Die Stimulation auch der "atypischen" PKC-Klasse (Lord & Pongracz 1995) könnte zusätzlich durch die Aktivierung von PI3-Kinasen möglich werden.

Für deren Beteiligung an der FcγR-vermittelten "respiratory burst"-Aktivität sprechen sowohl unsere Ergebnisse als auch die Beobachtungen in PMA-induzierten U937 Zellen (Ninomiya et al. 1994). Unsere Untersuchungen mit den PI3-K-spezifischen Antagonisten Wortmannin und LY294002 belegen mit jeweils deutlichen Hemmeffekten auf die Immunkomplex-stimulierte "burst"-Reaktion die Bedeutung von PI3-K-Aktivität bei deren Auslösung. Diese Befunde passen sehr gut zu dem beobachteten Anstieg an PI3-K-Aktivität in FcγR-stimulierten U937 Zellen, die zudem - als Beleg für ihre eigene Aktivierung durch PTK-vermittelte Phosphorylierung an Tyrosinresten - mittels anti-Phosphotyrosin-Antikörpern immunpräzipitierbar war (Ninomiya et al. 1994). Wortmannin verhinderte zudem in diesem Modell komplett die Phagozytose IgG-opsonierter Erythrozyten.

Aus der Gesamtsicht dieser Untersuchungen einschließlich der eigenen kann ein Signaltransduktionsweg der FcγR-vermittelten Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase abgeleitet werden, der nach geeigneter Stimulation von FcγR durch "cross-linking" zunächst die Rekrutierung und Aktivierung von NR-PTK der *src*-Familie beinhaltet. Deren Phosphorylierungsaktivität an Tyrosinresten sowohl des "ITAM"-Motivs des Rezeptors als auch von jetzt am Rezeptor bindungsfähigen Enzymen (PLCγ₁ und PI3-K; Nishibe et al. 1990; Exley et al. 1994) schafft die Voraussetzung für die Signalweiterleitung zur Aktivierung von PKC-Enzymen. Dies kann sowohl PtdIns-abhängig über PLCγ₁-Aktivität erfolgen ("klassische" und "neue" Isoformen) als auch durch PI3-K vermittelt durch

Stimulation "atypischer" Isoenzyme mittels deren Produkte wie $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$. PKC-Aktivität kann schließlich wie oben beschrieben direkt oder über MAPK zur Stimulation der Phospholipasen A_2 sowie D mit der daraus resultierenden "burst"-Reaktion führen (Abb. 49). Dieser Weg zeigt damit eine gewisse Verwandtschaft mit der Signalweiterleitung, die von Zytokinbindung an entsprechende Rezeptoren ausgelöst wird (Review: Kishimoto et al. 1994).

Die Strahlenempfindlichkeit dieses Signaltransduktionsweges nach Stimulation der mit 5 Gy bestrahlten Zellen mit Immunkomplexen (vgl. Abb. 25) war durch den Streß einer zusätzlichen Inhibition von PI3-K-Aktivität mittels Wortmannin (bis 100 nM) nicht steigerbar (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur vorgestellten Empfindlichkeit der G-Protein-assoziierten PI3-K (Stephens et al. 1994; s. Kap. 4.2.3.1.4) nach f-MLP-Stimulation der Zellen, eine Diskrepanz, die mit der Beteiligung verschiedener Isoenzyme der PI3-K (Hunter 1995a) in den unterschiedlichen Signaltransduktionspfaden (G-Protein- vs. PTK- bzw. PMA/PKC-vermittelt) erklärt werden könnte. Deren genauere Charakterisierung muß allerdings zukünftigen Experimenten vorbehalten bleiben.

4.3 Zusammenfassung der diskutierten Signaltransduktionswege

Abb. 49 zeigt in einer zusammenfassenden Darstellung die intrazellulären Signaltransduktionswege, wie sie sich nach Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase mit den drei eingesetzten Stimuli unter besonderer Berücksichtigung der hier vorgestellten Daten sowie der publizierten Befunde in Neutrophilen/HL-60 Zellen ergeben. Danach verursacht die Stimulation der Zellen mit dem Chemotaxin f-MLP durch G-Proteine vermittelt die direkte Aktivierung einer Phospholipase $\text{C}\beta$, einer Form von PI3-Kinase und vermutlich von NR-PTK. PLC(β)-Aktivität stellt aus dem Substrat PtdInsP_2 den ersten Lipid-2nd messenger, DAG, und InsP_3 zur - z.T. durch Ca^{2+} -Freisetzung unterstützen - Aktivierung von PKC-Isoenzymen vom "klassischen" bzw. "neuen" Typ bereit. Produkte von PI3-K-Aktivität können als Aktivatoren von "atypischen" PKC-Isoenzymen fungieren. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ schafft einerseits die Voraussetzungen für die volle Aktivierbarkeit der Phospholipasen D und A_2 , andererseits wird mit der dabei erzielten Aktivierung von Proteinphosphatasen (Bengis-Garber & Gruener 1995) ein "Abschalter" von Aktivierungsmechanismen durch Proteinkinase-Aktivität betätigt. PKC-Aktivität nach Stimulation mit f-MLP oder direkt mit Phorbol ester, z.B. PMA, phosphoryliert einerseits Komponenten der "respiratory burst"-Oxidase an Serin-Resten als Voraussetzung für deren Zusammenfügbarkeit im aktiven Komplex an der Plasmamembran und ist auch andererseits bei der Aktivierung der PLD und PLA_2 sowie von MAPK beteiligt. PTK und PI3-K sind in die Regulation von PLD-Aktivität mit einbezogen. Ein (nach NR-PTK-Stimulation) durch

f-MLP oder Immunkomplexe *Ras*- und *Raf*-vermittelter MAPK-abhängiger "Pathway" (Worthen et al. 1994) trägt (zusammen mit PKC-Aktivität) zur Stimulation von PLA₂-Aktivität bei. Beide Phospholipasen (D und A₂) greifen auf PtdCho als Substrat zurück und produzieren zwei weitere Lipid-"2nd messenger", PA und AA. Beide Lipide sind (auf unklare Art und Weise) bei der Aktivierung der Oxidase beteiligt und aktivieren auch PKC-Isoenzyme. Phosphatitsäure und DAGs werden durch PPH- und DAG-K-Aktivitäten ineinander umgewandelt und bestimmen über ihre Relationen zueinander über das Ausmaß der "respiratory burst"-Reaktion mit.

Nach FcγR-Stimulation werden NR-PTK-vermittelt sowohl PI3-K- als auch PLCγ-Enzyme aktiviert. Beide führen direkt über PtdIns(3,4,5)P₃- ("atypische" Isoenzyme) bzw. durch DAG-Produktion ($\pm$ Ca²⁺-Ionen, "klassische" und "neue" Isoenzyme) aus PtdInsP₂ zu PKC-Aktivität mit den daraus folgenden Konsequenzen für PLD-, PLA₂- und MAPK-sowie NADPH-Oxidase-Aktivitäten.

Die hier diskutierten Untersuchungen zeigen ein extrem komplexes Zusammenspiel vieler Enzyme und Metabolite, das in einem solchen relativ groben Schema (Abb. 49) in keiner Weise mit jedem Detail dargestellt werden kann. Die Komplexität und Redundanz dieses Systems ist auf der einen Seite notwendig, um dem biologischen Auftrag der Immunfunktion des "respiratory burst" für die Integrität des Gesamtorganismus voll gerecht werden zu können und um andererseits die Linie nicht zu überschreiten, welche die "burst"-Reaktion der Neutrophilen zu einem gefährlichen Aggressor für ihre unmittelbare Umgebung mit daraus resultierenden pathologischen Konsequenzen werden lassen kann. Die Evolution hat dabei ein System hervorgebracht, das aufgrund seiner Redundanz auch offensichtlich relativ problemlos in der Lage ist, Fehlregulationen einzelner seiner Elemente zu kompensieren, und bei dem offensichtlich nur der funktionelle Totalausfall ("Septische Granulomatose") oder die extreme Hyperreaktivität der Zellen (z.B. beim "ARDS-Syndrom") zu klinischen Konsequenzen führen.

4.4 Diskussion der Strahleneffekte auf die intrazelluläre Signalübertragung

Ausführliche Untersuchungen wie in der vorliegenden Form zur Strahlenwirkung auf Signaltransduktionswege sind praktisch nicht vorhanden. Unsere Experimente zur Signaltransduktion bei der Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase unter Bestrahlung ergänzen und erweitern die Befunde anderer Arbeitsgruppen, welche Ende der 80er Jahre begannen, das (therapeutische) Potential von Kenntnissen zur intrazellulären Signaltransduktion zu erforschen. Dabei hat sich besonders die Chicagoer Gruppe um R.R. Weichselbaum (Hallahan et al. 1989 bis 1994b; Sherman et al. 1990; Weichselbaum et al.

für PTK-Aktivität angesehen werden (Akiyama et al. 1987, Fukazawa et al. 1991), kann die Beteiligung von PTK-Aktivität abgeleitet werden. Der gemessene Anstieg von InsP_3 (Uckun et al. 1993) muß dann von einer $\text{PLC}(\gamma)$ -Aktivität in der Signalübertragungskaskade herrühren (Liao et al. 1992; Kobayashi et al. 1995), welche durch DAG- und $\text{InsP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung von PKC(s) der "klassischen" und/oder "neuen" Isoenzym-Gruppen (Lord & Pongracz 1995) die ebenfalls beobachtete Erhöhung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erklären könnte.

Bei den o.g. Arbeiten wird zum ersten Mal ein offensichtlich zu verallgemeinerndes Prinzip deutlich, nämlich, daß die Zelle auf (oxidativen) "Streß" unterschiedlicher Genese (ionisierende oder UV-Strahlung, H_2O_2 , Phorbol ester) mit einer relativ einheitlichen Reaktion, der Aktivierung von (Protein-Tyrosin)-Kinasen durch reaktive Sauerstoffspezies, antwortet. Diese Annahme belegen zusätzlich die Arbeiten von Stevenson et al. (1994; für MAPK), Kharbanda et al. [1995 (für *c-Abl*-Tyrosinkinase) und 1995a; für Streß-aktivierte Protein (SAP)-Kinase und PI3-K]. Interessanterweise ist die durch ionisierende Bestrahlung induzierte Aktivierung der SAP-Kinase in Ataxia teleangiectasia (AT)-Zellen (siehe dazu Kap. 4.5.1) offensichtlich defekt (Shafman et al. 1995). Daß die Geschehnisse an den Elementen der intrazellulären Signalübertragung ohne Beteiligung des Zellkernes ablaufen können, verdeutlicht der strahleninduzierte Anstieg des relativ neu entdeckten "2nd messengers" Ceramid (Haimovitz-Friedman et al. 1994) als Produkt des TNF- α -aktivierten Sphingomyelin/Sphingomyelinase-"Pathways" (Schütze et al. 1992; Wiegmann et al. 1994; Fuks et al. 1995) ebenso wie die UV-induzierte Aktivierung von NF- κ B (Devary et al. 1993) in Zellkern-freien Membran- bzw. Zytoplastenpräparationen.

Schließlich belegen die Ergebnisse von Boothman (Boothman et al. 1989 und 1994) die Induktion einer Vielzahl größtenteils bisher uncharakterisierter Proteine durch Bestrahlung ("XIPs, X-ray-induced proteins"). In vielen experimentellen Ansätzen, welche die Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Prasad et al. 1994) oder von Protoonkogen-Produkten (*c-Jun*, *c-Fos*), die als Transkriptionsfaktoren wirken, durch niedrige Dosen (0,25 - 2 Gy) aufzeigen (Martin et al. 1993; Prasad et al. 1995), kann diese durch Vorbehandlung der Zellen mit Antioxidanzien wie N-Acetyl-L-Cystein verhindert werden (Mohan & Meltz 1994). Daraus hat sich das Konzept der reaktiven Sauerstoffspezies als wichtige Signalübertragungsmoleküle für vielerlei zelluläre Antworten entwickelt (Khan & Wilson 1995).

Mehr das eigene Modell betreffend, zeigen Arbeiten aus der Dritschilo-Gruppe (Avila et al. 1993), daß PLD-Aktivität offensichtlich in manchen Modellen auf Bestrahlung reagiert. Die Regulation der PLD-Aktivität bei der Stimulation der "respiratory burst"-Reaktion (durch PKC, PI3-K und PTK) ist deshalb auch zuvor (vgl. Kap. 4.2.3.1.4) so ausführlich besprochen worden. Zwar finden wir in unserem System bisher keinen direkten Hinweis auf eine besondere Strahlenempfindlichkeit der vermuteten PLD-Aktivität, die HPLC-

Analysen der extrahierbaren Lipide aus HL-60 Zellen und Neutrophilen zeigen jedoch die Modulierbarkeit des DAG-Gehaltes dieser Zellen alleine durch Strahlendosen < 5 Gy (vgl. Abb. 47). Welche Enzymaktivität(en) (PLD, PPH, DAG-K, PtdIns-PLC, PtdCho-PLC, s. Kap. 4.2.3) für den beobachteten temporären Abfall des DAG-Gehaltes nach Bestrahlung verantwortlich ist (sind), können unsere Analysen derzeit nicht entscheiden. Die Daten von Avila et al. (1993) belegen jedoch in der relativ strahlenresistenten Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, SQ-20B (Weichselbaum et al. 1988), daß bereits eine klinisch-relevante γ -Dosis von 2 Gy zu einer Aktivierung der PLD führen kann. Der Befund basiert auf der Freisetzung radioaktiv markierter Produkte von PLD-Aktivität (Cholin, PA, und Ptd-Ethanol). Die Autoren schlagen deshalb das Enzym als neues Target ionisierender Strahlung vor, dessen Aktivität bei der Erarbeitung von Protokollen zur Risikoabschätzung im Strahlenschutz einbezogen werden könnte (Avila et al. 1993). Darüber hinausgehend konnte diese Arbeit jedoch keinen eigenen Beitrag zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus der PLD leisten. Unter Berücksichtigung des oben Gesagten zur Aktivierbarkeit von PLD durch PKC-Formen (vgl. auch Billah & Anthes 1990) und der erst kürzlich beobachteten Induktion und Phosphorylierung von PKC α durch vergleichbar niedrige Dosen (0,75 Gy und 1,5 Gy) in V79 Zellen (Hasan et al. 1996), kann auch im Falle der SQ-20B Zellen über einen derartigen PKC(α)-abhängigen PLD-Aktivierungsmechanismus in bestrahlten Zellen spekuliert werden.

Auch DAG-K-Aktivität hat sich in unserem Modell bestrahlter HL-60 Zellen (2 Gy am Tag 0 mit Messung des "respiratory burst" an den Tagen 5 bis 6 nach DMSO-Induktion) erstmals als strahlenempfindlich erwiesen. Dieser Befund stützt sich auf die Beobachtung eines durch Vorbehandlung der Zellen mit R59 022 verstärkbaren Strahleneffektes auf die PMA-, jedoch nicht auf die f-MLP-induzierte "burst"-Antwort, mit einer veränderten Kinetik und einer durch R59 022 zusätzlich reduzierten Gesamtaktivität der "burst"-Reaktion (Abb. 45). Für DAG-K als direktes Target ionisierender Strahlung gibt es bisher keine Hinweise in der Literatur. Ein Erklärungsversuch für die beobachteten Effekte bezieht deshalb das Sphingolipid Ceramid als möglichen physiologischen Inhibitor für DAG-K (s. Kap. 4.2.3.1.6; Younes et al. 1992) mit ein. Ceramid wird nach geeigneter Stimulation von Zellen durch Sphingomyelinase-Aktivität aus Sphingomyelin freigesetzt und soll eine "2nd messenger"-Funktion erfüllen (Schütze et al. 1992 und 1994; Wiegmann et al. 1994).

Ein Anstieg der zellulären Ceramid-Konzentration wird auch nach Bestrahlung beobachtet und bisher praktisch ausschließlich im Zusammenhang mit der Signalübertragung zur Induktion von (PKC-vermittelter) Apoptose diskutiert (Haimovitz-Friedman et al. 1994 und 1994a; Kolesnick et al. 1994; Fuks et al. 1995). Diese Ceramid-Freisetzung erfolgt ohne Beteiligung des Zellkerns, da sie auch in kernfreien Membranpräparationen beobachtet wird (Haimovitz-Friedman et al. 1994; Fuks et al. 1995). Strahleninduzierte

Ceramid-Freisetzung könnte somit in unserem System über die Inhibition der DAG-K zu einer verstärkten PKC-Aktivierung führen, die - ähnlich einer chronischen PMA-Behandlung - eine (teilweise) Depletion von PKC-Aktivität verursachen könnte. Unter der weiteren Voraussetzung, daß diese Depletion mehrere Tage bis zur Messung der "burst"-Antwort der bestrahlten HL-60 Zellen fortbesteht, könnte der beobachtete temporäre Einbruch der Aktivität bestrahlter Zellen 30 - 40 min nach PMA-Stimulation eine mögliche Erklärung finden. Zusätzliche Vorbehandlung dieser Zellen mit dem DAG-K-Antagonisten würde in dieser Hypothese - in Übereinstimmung mit den Daten der reduzierten Aktivität während der frühen Stimulationsphase (< 30 min; vgl. Abb. 45) - den vermuteten Strahlen-/Ceramid-Effekt weiter verstärken.

Alternativ wird Ceramid auch als Aktivator von Proteinphosphatasen vom Typ 2A diskutiert (Dobrowsky & Hannun 1993; Dobrowsky et al. 1993; Wong et al. 1995), die durch "Okadaic acid" inhibierbar sind (Ding & Badway 1992; Garcia et al. 1992; Lu et al. 1992; Djerdjouri et al. 1994; s. Kap. 3.2.5.2). Unsere Untersuchungen mit diesem Antagonisten von Typ 2A-Phosphatasen haben eine starke Serin-/Threonin-Proteinphosphatase-Aktivität in Granulozyten/HL-60 Zellen nachgewiesen. Da diese Enzymaktivität grundsätzlich in der Lage ist PKC-Aktivität zu antagonisieren, sind die Beobachtungen nach PMA-Stimulation der bestrahlten Zellen möglicherweise auch durch eine Ceramid-vermittelte Modulation von PPase-Aktivität erklärbar. Entsprechende Experimente zur Überprüfung beider Hypothesen sind angelaufen.

Unsere Ergebnisse erweitern somit die o.g. Befunde und fügen mit dem veränderten DAG-Gehalt der Zellen nach Bestrahlung sowie der aufgezeigten Strahlenempfindlichkeit von DAG-K- und PI3-K-Aktivitäten weitere Elemente der intrazellulären Signaltransduktion in die obige Auflistung strahlensensitiver Komponenten des Zytoplasmas/der Zellmembran ein.

4.5 Ausblick

4.5.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen - ein neues Zentrum strahlenbiologischer Forschung?

Mit der aufgezeigten Strahlenempfindlichkeit einer Isoform der PI3-K (p110 γ) ist in Neutrophilen ein mögliches neues Zentrum strahlenbiologischer Forschung identifiziert worden. PI3-Kinase-Aktivität ist in allerjüngster Zeit für die Strahlenbiologie aus zwei Gründen besonders interessant geworden. 1) Im Juni 1995 publizierten Savitsky et al. (1995) ihre Befunde, daß eine Mutation des sog. "ATM"-Gens vermutlich alleine für die autosomal rezessiv vererbte Krankheit der Ataxia teleangiectasia verantwortlich ist, und

daß das Protein-Produkt dieses Gens eine Domäne enthält, die große Ähnlichkeit mit mehreren bekannten PI3-Ks aus Hefen und Säugern besitzt. 2) Im Dezember 1995 wurden auch für die humane DNA-aktivierte/abhängige Proteinkinase (DNA-PK), die bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen entscheidend beteiligt sein soll (Blunt et al. 1995; Kirchgessner et al. 1995; Lees-Miller et al. 1995), Homologien mit der katalytischen p110-UE von PI3-K des Menschen und aus Hefen berichtet (Poltoratsky et al. 1995).

AT-Zelllinien sind aufgrund ihrer Strahlenempfindlichkeit, vermutlich wegen eines Reparaturdefektes, bereits schon seit einiger Zeit ein beliebtes und relativ gut analysiertes Modell in der strahlenbiologischen Forschung (Hall 1994). Sie sind durch Chromosomenaberrationen und Verlust der "Checkpoints" für DNA-Schäden im Zellzyklus gekennzeichnet (Houldsworth & Lavin 1980; Painter & Young 1980; Beamish & Lavin 1994; Beamish et al. 1994; Hunter 1995).

Beim homo- oder heterozygot betroffenen Menschen (weltweite Inzidenz 1 : 40.000 bis 1 : 100.000; Gatti et al. 1991) geht die Mutation des ATM-Gens neben den o.g. genetischen und Zellzyklus-Effekten mit schweren zellulären und humoralen Immundefizienzen und Prädispositionen für Krebserkrankungen einher (Savitsky et al. 1995). Diese klinisch relevanten und lebensverkürzenden Defekte könnten sich angesichts der jetzt bekannt gewordenen Zusammenhänge als die Auswirkungen einer fehlerhaften intrazellulären Signaltransduktion, die von PI3-Kinase-Aktivität abhängt, erweisen (Savitsky et al. 1995).

PI3-K stellen nach derzeitigem Kenntnisstand eine Familie mit 11 Mitgliedern dar (Hunter 1995a). Als gemeinsames Erkennungsmerkmal wurde bisher der heterodimere Aufbau aus einer regulatorischen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 85 kDa (p85-UE) sowie einer intrinsisch-katalytischen p110-UE angesehen (Carpenter et al. 1990; Hunter 1995a). Die Arbeiten von Stoyanov et al. (1995) demonstrieren jedoch mittlerweile Abweichungen von diesem Muster, indem in humanen Zellen eine G-Protein-assoziierte PI3-K (p110 γ) charakterisiert werden konnte, die nicht mit einem p85-Protein interagiert (vgl. Kap. 4.2.3.1.4). Im Dimer fungiert die p85-UE nach ihrer Rekrutierung an die Plasmamembran auch als Adaptor-ähnliches Molekül für die p110-UE und bindet über ihre SH₂ ("src homology")-Protein-Domänen in Wachstumsfaktor-aktivierten Signalübertragungsvorgängen an phosphorylierte Tyrosin-Reste in Rezeptor- und NR-PTK (Brugge 1993; Kapeller & Cantley 1994; Heldin 1995). Sie wird dabei an einem Serinrest (Ser-608) autophosphoryliert, was zu ihrer Inaktivierung führt (Carpenter et al. 1993; Dhand et al. 1994). In humanen Monozyten wurde außerdem eine M-CSF-induzierte Phosphorylierung an einem Tyrosinrest der p85-UE (pY-408) identifiziert, die als Bindungsstelle für eine SH₂-Domäne des Adaptormoleküls Grb2 ("growth factor binding protein-2") fungiert (Saleem et al. 1995). Über die Assoziation des PI3-K/Grb2-Komplexes mit dem "Guaninnukleotid-Austauschprotein Sos" ("son-of-sevenless") besteht die Möglichkeit der

Signaltransduktion vom Wachstumsfaktor in einen *Ras*-abhängigen "Pathway" (Saleem et al. 1995), der zu einer modulierten Genexpression führen könnte (Khosravi-Far & Der 1994; Kishimoto et al. 1994; Marshall 1995).

Darüber hinaus sind PI3-K durch ihre duale Kinase-Aktivitäten, sowohl für die 3'-Position des Inositolrings in PtdIns als auch für Serin-Reste in Proteinen, die beide durch Wortmannin hemmbar sind, ausgezeichnet (Lam et al. 1994; Dhand et al. 1994; Hunter 1995a). Sie stellen dadurch ideale "Kupplungsstellen" zwischen verschiedenen Signaltransduktionswegen dar, einerseits zwischen Wegen, welche die Signalweitergabe mittels Phosphorylierungen an Proteinen ausführen ("MAP-Kinasen-Pathway"), und andererseits zwischen solchen, die zur Informationsweiterleitung Lipid-"2nd messenger" benötigen (PKC-abhängige). Konkret werden die Lipidprodukte der PI3-K als in vivo-(Ko)aktivatoren sowohl der "neuen" PKC-Isoenzyme δ , ϵ und η als auch der "atypischen" (ζ) diskutiert (Nakanishi et al. 1993; Toker et al. 1994; Lord & Pongracs 1995); weitere Effektorproteine für PtdIns-3'-Phosphat-Verbindungen sind - mit Ausnahme der Bindung von PtdIns(3,4,5)P₃ an die p85-UE der PI3-K selbst (Rameh et al. 1995) - derzeit nicht bekannt (Hunter 1995a). Sie werden anscheinend auch nicht metabolisiert und stellen damit eine eigene, neue Klasse an Lipid-"2nd messenger" dar (Fry 1994; Kapeller & Cantley 1994).

Das Vorhandensein von PI3-K-Aktivität von Neutrophilen ist erst in jüngerer Zeit bekannt geworden (Arcaro & Wymann 1993; Stephens et al. 1994; Vlahos et al. 1994 und 1995). Unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern diese Befunde. In unserem Modell der Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase in Neutrophilen und zu Neutrophilen-ähnlichen induzierten HL-60 Zellen ist PI3-K-Aktivität in jedem der drei näher charakterisierten Signaltransduktionswege beteiligt (s. Kap. 4.2 und Abb. 49). Dabei zeigen sich zum ersten Mal Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit dieser drei Aktivitäten. Während die G-Protein-vermittelte PI3-K-Aktivität (Stephens et al. 1994; Stoyanov et al. 1995) nach Stimulation des f-MLP-Rezeptors und Inhibition des Enzyms mit niedrigen Konzentrationen (nM-Bereich) an Wortmannin (oder LY294002) sich als strahlenempfindlich erwies, war nach PMA-Stimulation oder nach Aktivierung der Oxidase über FcγR in Wortmannin-vorbehandelten Zellen kein besonderer Strahleneffekt feststellbar.

Aus der bekannten Strahlenempfindlichkeit der AT-Zellen (s.o.) und den jetzt nachgewiesenen Zusammenhängen zwischen deren Gendefekt und PI3-K-Aktivität ließ sich die Beeinflussbarkeit der Strahlenempfindlichkeit normaler Zellen durch Inhibition von PI3-K ableiten. Entsprechende, aber vorläufige eigene Experimente mit HeLa-Zellen, die 15 min vor Bestrahlung mit 10 μ M LY294002 behandelt wurden, belegen bereits die strahlensensibilisierende Wirkung der PI3-K-Inhibition (Ergebnisse nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den Befunden nach allerdings hohen Konzentrationen (bis 100 μ M) an Wortmannin (Price & Youmell 1996), die Zweifel an der Spezifität der Inhibitorwirkung

aufkommen lassen (s. Kap. 4.2.3.1.4), wird eine Reduktion der überlebenden Fraktion bei Dosen > 3 Gy um ca. den Faktor 2 im Klonogenitätstest gefunden.

Pharmakologische Eingriffe in PI3-K-Aktivität bieten also die Option der Modulation von Strahlensensitivität und ergeben evtl. dadurch eine ganz neue Arbeitsrichtung in der strahlenbiologischen Forschung. Das hier vorgestellte HL-60 Modell könnte sich dabei als sehr gut einsetzbar erweisen. Die Zellen sind durch das Vorhandensein von PI3-K-Aktivitäten mit unterschiedlichen Strahlensensitivitäten gekennzeichnet. Die PI3-K-Isoformen können durch verschiedenartige Stimuli selektiv angesprochen werden. Dazu zählen heterotrimere G-Protein-assoziierte Agonisten (Formylpeptid oder Zytokine wie IL-8) ebenso wie Integrin- oder FcγR-Liganden, die (Nichtrezeptor)-Tyrosinkinasen vermittelt die Zellen aktivieren.

Mit der "respiratory burst"-Reaktion differenzierter HL-60 Zellen sowie der intrinsischen Bereitschaft von HL-60 Zellen zur Apoptose sind darüber hinaus relativ gut meßbare biologische Endpunkte als Kontrollen für erfolgreiche Signaltransduktionsprozesse vorhanden. Die HL-60 Zellen können zu unterschiedlichen Zeiten entlang der induzierten Reifung (zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen) bestrahlt werden, wodurch neben den Akut-effekten auch die genetischen Manifestationen von Strahlenwirkung auf die Signaltransduktion in diskreten Progenitorstadien der späten Myelopoese meßbar werden. Aufgrund der jüngsten Erkenntnisse über die Zusammenhänge zwischen dem genetischen Defekt der Ataxia teleangiectasia und der vermutlich fehlenden/unzureichenden Aktivität von PI3-Kinase(n) ließen sich HL-60 Zellen unter Verwendung von PI3-K-Antagonisten oder mit Hilfe der "Antisense"-Technik (Crooke 1995) in einen (vorübergehenden) AT-ähnlichen Zustand überführen, an dem z.B. die Effektivität einer Substitutionstherapie durch PI3-K-Produkte auf die Strahlenempfindlichkeit überprüft werden könnte. Der Einfluß dieser Verbindungen auf die Manipulationsfähigkeit der Zellen zu höherer oder niedrigerer Empfindlichkeit oder auch auf die Apoptosebereitschaft könnte getestet werden. PI3-K-Produkte könnten in einem solchen Modell als sog. "biological response modifier" ähnlich den Strahlenschutzsubstanzen oder den "hypoxic sensitizer" (Hall 1994) in der experimentellen Strahlentherapie fungieren. Ein besseres Verständnis der intrazellulären Signaltransduktionsprozesse, die möglicherweise die Neigung zur Apoptose bedingen, könnte zur gezielten Modulation apoptotischer Prozesse in der Therapie maligner Tumoren beitragen.

4.5.2 Bedeutung der Kenntnisse über die Strahlenempfindlichkeit von PKC für zukünftige Therapieansätze

Über die zuvor (Kap. 4.5.1) zu PI3-K gemachten Ausführungen hinaus, bestätigen unsere Befunde zur Strahlenempfindlichkeit von PKC-Aktivität die Notwendigkeit sich mit der

Regulation dieser Enzymfamilie auseinander zu setzen. Da PKC-Aktivität eine zentrale Rolle bei der Regulation sehr vieler zellulärer Prozesse wie Proliferation und Differenzierung, beigemessen wird, beschäftigen sich einige Arbeitsgruppen mit der (Fort-)Entwicklung von Inhibitoren von PKC-Isoenzymen (Budworth & Gescher 1995; Grunicke 1995; Ikegami et al. 1995; Lord & Pongracz 1995). Die beiden letztgenannten Autoren führen neben Krebs eine ganze Reihe von weiteren Erkrankungen auf, die mit veränderter PKC-Aktivität und -Isoenzymexpression einhergehen. Dazu zählen immunologische Krankheiten wie AIDS, ebenso wie zystische Fibrose, Alzheimer'sche Krankheit, Psoriasis und Diabetes (Lord & Pongracz 1995). Ihnen allen gelten die Bestrebungen durch pharmakologische Modulation von PKC-Aktivität in der Therapie regulierend einzugreifen.

Dazu gehören auch die Untersuchungen von Robinson et al. (1995), die einen möglichen physiologischen Inhibitor von PKC, Alkylglycerol, ein Metabolit des Phospholipid-Stoffwechsels, als ein antineoplastisches Agens diskutieren. Die Konzentration dieser Substanzklasse ist ebenfalls durch ionisierende (und UV)-Bestrahlung von differenzierten HL-60 Zellen modulierbar (Ergebnisse in einer Dissertation; Schade 1996; vgl. auch Kap. 3.3). Die Bedeutung der Veränderungen der Alkylglycerole nach Bestrahlung für die Regulation von PKC-Aktivität ist völlig unklar und könnte im HL-60 Modell, das mit den vorgestellten Daten für derartige Analysen etabliert wurde, weiter untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen die grundsätzliche Strahlenempfindlichkeit von zellulären Targets außerhalb des Zellkerns. Die intrazelluläre Signalübertragung, über deren bereits jetzt ungeheure Komplexität unser Wissen praktisch täglich zunimmt, wird dabei nach Bestrahlung nur von wenigen Arbeitsgruppen weltweit untersucht. Das tiefere Verständnis dieser Prozesse könnte jedoch die Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bilden.

5. Zusammenfassung

Die Prozesse, welche zur Weiterleitung extrazellulär auftreffender Signale durch die Plasmamembran und das Zytosol ggf. bis in den Kern führen, stehen derzeit weltweit im Zentrum vieler biomedizinischer Forschungsrichtungen. Vom detaillierten Studium dieser sog. intrazellulären Signaltransduktionsabläufe erwartet man die Identifikation neuer Angriffspunkte für eine chemische und physikalische Intervention als Ansätze für eine kausal-orientierte Therapie. Dieser Ansatz erscheint insbesondere auch für onkologische Erkrankungen von Interesse, da die Entstehung und Ausbreitung der Tumorerkrankung als eine Fehlregulation von Signalübertragungen aufgefaßt werden kann. Über die Beeinflussbarkeit der Signaltransduktionskaskaden durch ionisierende Strahlung liegen bisher nur sehr wenige Daten vor.

Der Intermediärstoffwechsel von Zellen galt lange Zeit als ausgesprochen unempfindlich gegenüber kleineren Strahlendosen, wie sie z.B. bei der fraktionierten Strahlentherapie angewandt werden. Erst in den letzten Jahren ergaben sich Hinweise, daß neben dem klassischen Target ionisierender Strahlung, der DNA des Zellkerns, auch Prozesse im Zytosol und an der Plasmamembran strahlenempfindlich reagieren können.

Unsere Untersuchungen zur Wirkung ionisierender Strahlung auf die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgten ex vivo an frischen humanen neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes sowie in vitro an der etablierten Leukämie-Zelllinie HL-60. Diese permanente Zelllinie wird üblicherweise als Promyelozyten-artig eingestuft. Sie zeigt im Klonierungstest mit einem D_0 -Wert von ca. 0,6 Gy und einer D_q von 0 Gy eine Radiosensitivität, welche der humaner hämatopoetischer Progenitorzellen sehr ähnlich ist und dient daher als Modell für Untersuchungen der Strahlenwirkung auf diesen Zelltyp.

Die Zelllinie ist durch ihre Induzierbarkeit zur Differenzierung zu allen myeloischen Zellformen besonders gekennzeichnet. Der hier verwandte Induktor, Dimethylsulfoxid (DMSO), führt innerhalb von ca. einer Woche zur Differenzierung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen. Die dabei ablaufenden Prozesse und deren Beeinflussbarkeit durch Bestrahlung wurden charakterisiert. Die Periode der Differenzierung ist gekennzeichnet durch den Verlust der Proliferationsfähigkeit sowie der Ausprägung von Differenzierungsmerkmalen auf verschiedenen Ebenen.

1) Die Induktion der Differenzierung initiiert die Expression von Oberflächenantigenen aus der Gruppe der β_2 -Integrine der Adhäsionsmoleküle (CD11b/CD11c-CD18-Komplexe), von Rezeptoren für bakterielle Lipopolysaccharide (CD14) sowie für ein Chemotaxin, das formylierte Tripeptid f-MLP (Formylpeptid-Rezeptor). Bestrahlung undifferenzierter HL-60 Zellen mit Dosen von 1 Gy erhöht 2 - 4 Tage nach Induktion der Differenzierung durch DMSO-Behandlung den Anteil Antigen-/Rezeptor-positiver Zellen an der Gesamt-

population Epitop-abhängig um 15 - 25%, was auf einen strahleninduzierten/-unterstützten Differenzierungsprozeß hindeutet.

2) Nach Differenzierung der HL-60 Zellen mit DMSO entspricht die erworbene Fähigkeit zur Phagozytose ca. 60% der Kapazität reifer neutrophiler Granulozyten.

3) Im Rahmen der Differenzierung kommt es zu molekularen Prozessen unter Einbeziehung der β -Actin-Komponente des Zytoskeletts, die es der Zelle erlauben, auf geeignete exogene Stimuli mit einem "respiratory burst" zu antworten. Sowohl die Regulation der Transkription als auch der Translation des β -Actins wurden als strahlensensibel (7 1 Gy) identifiziert.

4) Die Differenzierung der HL-60 Zellen beinhaltet ferner die Fähigkeit, auf eine Aktivierung durch Phorbol ester mit einer Verdoppelung von Proteinkinase C-Aktivität zu reagieren. Die Isoenzyme der Proteinkinase C müssen zur vollen Aktivierbarkeit entlang einem funktionsfähigen Zytoskelett aus dem Zytosol an die Plasmamembran "translozieren", in die aus Phospholipase-Aktivität stammende Lipidmetabolite (Diacylglycerole, DAG) eingelagert sind. Sowohl die PKC-Aktivität als auch ihre Translokationsfähigkeit wurden durch Bestrahlung der HL-60 Zellen mit 1 Gy reduziert, was einen Erklärungsansatz für die signifikante radiogene Verminderung der "respiratory burst"-Aktivität nach PMA-Stimulation bietet.

5) Durch pharmakologische Antagonisierung von PKC-Isoenzymen (mit Staurosporin oder H-7), durch Inhibition der Phospholipasen C und A₂ (mit U73122 und D609 bzw. Mepacrin oder Pentoxifyllin) und durch Inhibition von Proteintyrosin-Kinasen (mit Genistein oder Herbimycin A) läßt sich die Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase unterdrücken.

6) Die Inhibition von Proteinphosphatasen (durch Ortho-Vanadat für Proteintyrosin-Phosphatasen oder "Okadaic acid" für Proteinserin/-threonin-Phosphatasen) verstärkt die f-MLP-induzierte "respiratory burst"-Aktivität bis zu 300%. Dies unterstreicht die Bedeutung der Proteinphosphatasen für die Balancierung der Oxidase-Aktivität. "Respiratory burst"-Aktivität von Phagozyten ist ein essentielles Element der unspezifischen Immunantwort, deren Dysfunktion mit bekanntermaßen schwerwiegenden Erkrankungen wie der "Septischen Granulomatose" einhergeht.

7) Für das Ausmaß der Reaktion ist auch die Balance zwischen den antagonistisch wirksamen, DAG und Phosphatitsäure metabolisierenden Enzymen, der DAG-Kinase und der Phosphatidyl-Phosphohydrolase (PPH), von Belang.

8) Der DAG-Gehalt differenzierter, aber unstimulierter HL-60 Zellen und von Zellen nach f-MLP-Stimulation wird durch Bestrahlung mit 5 Gy kurzfristig (< 60 min) um bis zu 50% reduziert. DAG wird eine zentrale Bedeutung als physiologischer Lipid-"2nd messenger" bei der Stimulation von PKC-Isoenzymen zugeschrieben.

9) Unter zusätzlicher Antagonisierung mit dem Kinase-Inhibitor R59 022 erwies sich auch die DAG-Kinase-Aktivität differenzierter HL-60 Zellen nach PMA-Stimulation als sensibel gegenüber einer Bestrahlung mit 2 Gy.

10) Die blockierte Metabolisierung von Phosphatitsäure durch Propranolol verachtfachte den "respiratory burst", was auf eine direkte "2nd messenger"-Funktion dieses Lipids bei der Zusammenführung und/oder Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes hinweist.

11) Die durch FcγR-Stimulation aktivierte "respiratory burst"-Reaktion von Granulozyten ist strahlensensibel. Die Bestrahlung der Zellen mit 5 Gy unmittelbar vor der Stimulation reduziert die "burst"-Reaktion um bis zu 40%.

12) Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K)-Aktivität ist bei allen drei untersuchten Signaltransduktionswegen der Zellen (nach Stimulation mit PMA, f-MLP oder Immunkomplexen) beteiligt. Bestrahlung von Granulozyten mit 5 Gy verstärkt bei f-MLP-Stimulation den inhibitorischen Effekt von Wortmannin auf PI3-K-Aktivität und identifiziert damit die p110(γ)-Untereinheit der PI3-K-Aktivität dieses "Pathways" als strahlenempfindlich.

Zusammenfassend wirkt ionisierende Strahlung auf wenigstens vier eindeutig definierte Elemente der intrazellulären Signaltransduktion, die bei der Regulation des "respiratory burst" beteiligt sind: PKC-, DAG-K-, PI3-K-Aktivitäten und DAG-Gehalt sowie - bisher ohne exakte Lokalisierbarkeit im "Pathway" - auch auf die FcγR-stimulierte Reaktion.

Die Analysen zur Aktivierung der "respiratory burst"-Oxidase weisen insgesamt auf ein äußerst komplexes Geschehen mit sehr vielen Quervernetzungen, Rückkopplungen und Parallelschaltungen hin. Unsere Befunde ohne Bestrahlung bestätigen die zuvor bekannten groben Verläufe der Signaltransduktionswege zur Aktivierung der Oxidase. Sie erhärten im Detail hypothetisierte Sequenzen von Elementen der Signalweiterleitung (z.B. Zusammenwirken von PTK-/PI3-K-/PLD-Aktivitäten) und unterstreichen die Bedeutung anderer Elemente (z.B. DAG-K-, PPH- und PI3-K-Aktivitäten) bei der Regulation des "burst".

Die Ergebnisse nach Bestrahlung der Zellen mit relativ kleinen Strahlendosen (≤ 5 Gy) weisen in eine völlig neue Richtung. Sie identifizieren neben bereits bekannten (PKC) erstmals weitere zytoplasmatische/membranständige Komponenten von Signaltransduktionswegen (DAG-K- und PI3-K-Aktivitäten sowie DAG-Gehalt) als strahlensensible Elemente. Die Befunde nach Bestrahlung tragen zur Etablierung von Untersuchungen zur intrazellulären Signaltransduktion als experimentelles System in der Strahlenbiologie bei, indem neue strahlenbiologische Targets identifiziert wurden. Besonders die dargestellten Befunde zur Modulationsmöglichkeit von PI3-Kinase-Aktivitäten, zu denen auch das kürzlich identifizierte Ataxia teleangiectasia-Gen gehört, eröffnen neue Wege zur Untersuchung der individuellen Strahlenempfindlichkeit. Sie bilden eine mögliche Basis für zukünftige Therapieansätze bei Erkrankungen, die mit einer Fehlsteuerung von Signaltransduktionsvorgängen einhergehen.

6. Literatur

Abend, M., A. Rhein, K.-P. Gilbertz, W.F. Blakeley & D. van Beuningen: Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 315-326, 1995.

Abrass, C.K.: Fc receptor-mediated phagocytosis: Abnormalities associated with diabetes mellitus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 58, 1-17, 1991.

Agarwal, A., P. Salem & K.C. Robbins: Involvement of p72^{syk}, a protein-tyrosine kinase, in Fc γ receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 268, 15900-15905, 1993.

Agwu, D.E., L.C. McPhail, M.C. Chabot, L.W. Daniel, R.L. Wykle & C.E. McCall: Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264, 1405-1413, 1989.

Agwu, D.E., L.C. McPhail, R.L. Wykle & C.E. McCall: Mass determination of receptor-mediated accumulation of phosphatidate and diglycerides in human neutrophils measured by Coomassie blue staining and densitometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 79-86, 1989a.

Agwu, D.E., L.C. McPhail, S. Sozzani, D.A. Bass & C.E. McCall: Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects on activation of NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 88, 531-539, 1991.

Aihara, H., Y. Asoaka, K. Yoshida & Y. Nishizuka: Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11062-11066, 1991.

Akiyama, T., J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya & Y. Fukami: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262, 5592-5595, 1987.

Arcaro, A. & M.P. Wymann: Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* 296, 297-301, 1993.

Avila, M.A., G. Otero, J. Cansado, A. Dritschilo, J.A. Velasco & V. Notario: Activation of phospholipase D participates in signal transduction pathways responsive to γ -radiation. *Cancer Res.* 53, 4474-4476, 1993.

Azuma, E.K., S. Kitagawa, A. Yuo, H. Mizoguchi, K. Umezawa, F. Takaku & M. Saito: Activation of the respiratory burst and tyrosine phosphorylation of proteins in human neutrophils: no direct relationship and involvement of protein kinase C-dependent and -independent signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 213-223, 1993.

Babior, B.M.: Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298, 721-725, 1978.

Babior, B.M.: The respiratory burst oxidase. *Trends Biochem. Sci.* 12, 241-243, 1987.

Babior, B.M. & R.C. Woodman: Chronic granulomatous disease. *Sem. Hematol.* 27, 247-259, 1990.

Babior, B.M., J.T. Curnutte & B.J. McMurrich: The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J. Clin. Invest.* 58, 989-996, 1976.

Babior, B.M., R.S. Knipes & J.T. Curnutte: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741-744, 1973.

Badwey, J.A., R.W. Erickson & J.T. Curnutte: Staurosporine inhibits the soluble and membrane-bound protein tyrosine kinases of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 423-429, 1991.

Baggiolini, M. & C.A. Dahinden: CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today* 15, 127-133, 1994.

Baldrige, C.W. & R.W. Gerard: The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* 103, 235-236, 1933.

Ballinger, C.A., C. Mendis-Handagama, J.R. Kalmar, R.R. Arnold & J.M. Kinkade, Jr.: Changes in the localization of catalase during differentiation of neutrophilic granulocytes. *Blood* 83, 2654-2668, 1994.

Barak, L.S., R.R. Yocum, E.A. Nothnagel & W.W. Webb: Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-phalloidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 980-984, 1980.

Bass, D.A., J.W. Parce, L.R. DeChatelet, P. Szejda, M.C. Seeds & M. Thomas: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910-1917, 1983.

Bastian, N.R. & J.B. Hibbs, Jr.: Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 131-139, 1994.

Beamish, H. & M.F. Lavin: Radiosensitivity in ataxia telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 175-184, 1994.

Beamish, H., K.K. Khanna & M.F. Lavin: Ionizing radiation and the cell cycle progression in ataxia telangiectasia. *Radiat. Res.* 138, S130-S133, 1994.

Becker, E.L.: The short and happy life of neutrophil activation. *J. Leukoc. Biol.* 47, 378-389, 1990.

Bellavite, P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad. Biol. Med.* 4, 225-262, 1988.

Ben-Av, P. & M. Liscovitch: Phospholipase D activation by the mitogens platelet-derived growth factor and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in NIH-3T3 cells. *FEBS Lett.* 259, 64-66, 1989.

- Bengis-Garber, C. & N. Gruener: Involvement of protein kinase C and the protein phosphatases 1 and/or 2A in p47 phox phosphorylation in formylMet-Leu-Phe stimulated neutrophils: studies with selective inhibitors Ro 31-8220 and calyculin A. *Cell. Signal.* 7, 721-732, 1995.
- Berkow, R.L. & R.W. Dodson: Tyrosine-specific protein phosphorylation during activation of human neutrophils. *Blood* 75, 2445-2452, 1990.
- Berridge, M.J. & R.F. Irvine: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341, 197-205, 1989.
- Beutler, B. & A. Cerami: Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 505-518, 1988.
- Bhatia, K., Y. Pommier, C. Giri, A.J. Fornace, M. Imaizumi, T.R. Breitmann, B.W. Cherney & M.E. Smulson: Expression of the poly(ADP-ribose) polymerase gene following naturally induced DNA strand breakage and effect of hyperexpression on DNA repair. *Carcinogenesis* 11, 123-128, 1990.
- Bianco, J.A., F.R. Appelbaum, J. Nemunaitis, J. Almgren, F. Andrews, P. Kettner, A. Shields & J.W. Singer: Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. *Blood* 78, 1205-1211, 1991.
- Billah, M.M. & J.C. Anthes: The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem. J.* 269, 281-291, 1990.
- Billah, M.M., S. Eckel, T.J. Mullmann, R.W. Egan & M.I. Siegel: Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264, 17069-17077, 1989.
- Billah, M.M., J.K. Pai, T.J. Mullman, R.W. Egan & M.I. Siegel: Regulation of phospholipase D in HL-60 granulocytes. Activation by phorbol esters, diglyceride, and calcium ionophore via protein kinase-independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 264, 9069-9076, 1989a.
- Birnie, G.D.: The HL-60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer* 58, 41-45, 1988.
- Bjørkøy, G., A. Øvervatn, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat & T. Johansen: Evidence for a bifurcation of the mitogenic signaling pathway activated by Ras and phosphatidyl-choline-hydrolyzing phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 270, 21299-21306, 1995.
- Bleasdale, J.E., N.R. Thakur, R.S. Gremban, G.L. Bundy, F.A. Fitzpatrick, R.J. Smith & S. Bunting: Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorpho-nuclear neutrophils. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 756-768, 1990.
- Blobe, G.C., W.A. Khan & Y.A. Hannun: Protein kinase C: Cellular target of the second messenger arachidonic acid? Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids 52, 129-135, 1995.

- Blunt, T., N.J. Finnie, G.E. Taccioli, G.C. Smith, J. Demengeot, T.M. Gottlieb, R. Mizuta, A.J. Varghese, F.W. Alt, P.A. Jeggo & S.P. Jackson: Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 80, 813-823, 1995.
- Bodey, G.P., M. Buckley, Y.S. Sathe & E.J. Freireich: Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med.* 64, 328-340, 1966.
- Bokoch, G.M.: Regulation of phagocyte function by low molecular weight GTP-binding proteins. *Eur. J. Haematol.* 51, 313-317, 1993.
- Bokoch, G.M.: Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 5, 109-113, 1995.
- Bolen, J.B., R.B. Rowley, C. Spana & A.Y. Tsygankov: The *Src* family of tyrosine protein kinases in hematopoietic signal transduction. *FASEB J.* 6, 3403-3409, 1992.
- Bonser, R.W., N.T. Thompson, R.W. Randall & L.G. Garland: Phospholipase D activation is functionally linked to superoxide generation in the human neutrophil. *Biochem. J.* 264, 617-620, 1989.
- Bonser, R.W., N.T. Thompson, R.W. Randall, J.E. Tateson, G.D. Spacey, H.F. Hodson & L.G. Garland: Demethoxyviridin and wortmannin block phospholipase C and D activation in the human neutrophil. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1237-1241, 1991.
- Boogaerts, M.A., S. Malbrain, P. Meeus, L. van Hove & G.E. Verhoef: In vitro modulation of normal and diseased human neutrophil function by pentoxifylline. *Blut* 61, 60-65, 1990.
- Boothman, D.A., I. Bouvard & E.N. Hughes: Identification and characterization of X-ray-induced proteins in human cells. *Cancer Res.* 49, 2871-2878, 1989.
- Boothman, D.A., G. Majmudar & T. Johnson: Immediate X-ray-inducible responses from mammalian cells. *Radiat. Res.* 138, S44-S46, 1994.
- Borregaard, N.: The respiratory burst: an overview. In: *The Respiratory Burst and Its Physiological Significance* (A.J. Sbarra & R.R. Strauss, eds.), Plenum Press, New York, 1988, p. 5-18.
- Borregaard, N., J.M. Heiple, E.R. Simons & R.A. Clark: Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* 97, 52-61, 1983.
- Boulay, F., M. Tardif, L. Brouchon & P. Vignais: The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry* 29, 11123-11133, 1990.
- Boulay, F., L. Mery, M. Tardif, L. Brouchon & P. Vignais: Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. *Biochemistry* 30, 2993-2999, 1991.
- Bourgoin, S. & S. Grinstein: Peroxides of vanadate induce activation of phospholipase D in HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 267, 11908-11916, 1992.

Bourgoin, S., P. E. Poubelle, N.W. Liao, K. Umezawa, P. Borgeat & P.H. Naccache: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor primes phospholipase D activity in human neutrophils in vitro: role of calcium, G-proteins and tyrosine kinases. *Cell. Signal.* 4, 487-500, 1992.

Boyd, A.W. & D. Metcalf: Induction of differentiation in HL-60 leukaemic cells: a cell cycle dependent all-or-none event. *Leukemia Res.* 8, 27-43, 1984.

Breitman, T.R., E. Selonick & S.J. Collins: Induction of differentiation of the human promyelocytic cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2936-2940, 1980.

Brestel, E.P.: Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 482-488, 1985.

Briscoe, C.P. A. Martin, M. Cross & M.J.O. Wakelam: The roles of multiple pathways in regulating bombesin-stimulated phospholipase D activity in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* 306, 115-122, 1995.

Brown, H.A., S. Gutowski, C.R. Moomaw, C. Slaughter & P.C. Sternweis: ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-1144, 1993.

Brugge, J.S.: New intracellular targets for therapeutic drug design. *Science* 260, 918-919, 1993.

Brunkhorst, B.A., K.G. Lazzari, G. Strohmeier, G. Weil & E.R. Simons: Calcium changes in immune complex-stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266, 13035-13043, 1991.

Brunkhorst, B.A., G. Strohmeier, K. Lazzari, G. Weil, D. Melnick, H.B. Fleit & E.R. Simons: Differential role of Fc γ RII and Fc γ RIII in immune complex stimulation of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267, 20659-20666, 1992.

Budworth, J. & A. Gescher: Differential inhibition of cytosolic and membrane-derived protein kinase C activity by staurosporine and other kinase inhibitors. *FEBS Lett.* 362, 139-142, 1995.

Bueb, J.-L., A. Gallois, J.-C. Schneider, J.-P. Parini & E. Tschirhart: A double-labelling fluorescent assay for concomitant measurements of $[Ca^{2+}]_i$ and $O_2^{\cdot -}$ production in human macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1244, 79-84, 1995.

Büscher, D., R.A. Hipskind, S. Krautwald, T. Reimann & M. Baccarini: *Ras*-dependent and -independent pathways target the mitogen-activated protein kinase network in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 15, 466-475, 1995.

Bursten, S., R. Weeks, J. West, T. Le, T. Wilson, D. Porubek, J.A. Bianco, J.W. Singer & G.C. Rice: Potential role of phosphatidic acid in mediating the inflammatory responses to TNF- α and IL-1 β . *Circulatory Shock* 44, 14-29, 1994.

- Cai, H., P. Erhardt, J. Troppmair, M.T. Diaz-Meco, G. Sithanandam, U.R. Rapp, J. Moscat & G.M. Cooper: Hydrolysis of phosphatidylcholine couples *Ras* to activation of *Raf* protein kinase during mitogenic signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7645-7651, 1993.
- Cambier, J.C.: Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* 155, 3281-3285, 1995.
- Carp, H.: Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *J. Exp. Med.* 155, 264-275, 1982.
- Carpenter, C.L., B.C. Duckworth, K.R. Auger, B. Cohen, B.S. Schaffhausen & L.C. Cantley: Purification and characterization of phosphoinositide 3-kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265, 19704-19711, 1990.
- Carpenter, C.L., K.R. Auger, B.C. Duckworth, W.-M. Hou, B.S. Schaffhausen & L.C. Cantley: A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1657-1665, 1993.
- Cassimeris, L., H. McNeill & S.H. Zigmond: Chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes contain two populations of actin filaments that differ in their spatial distribution and relative stability. *J. Cell Biol.* 110, 1067-1075, 1990.
- Celis, J.E., P. Madsen, A. Celis, H.V. Nielsen & B. Gesser: Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett.* 220, 1-7, 1987.
- Chabot, M.C., L.C. McPhail, R.L. Wykle, D.A. Kennerly & C.E. McCall: Comparison of diglyceride production from cholin-containing phosphoglycerides in human neutrophils stimulated with N-formyl-methionylleucylphenylalanine, ionophore A23187 or phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem. J.* 286, 693-699, 1992.
- Chanock, S.J., J. El Benna, R.M. Smith & B.M. Babior: The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269, 24519-24522, 1994.
- Chaplinsky, T.J. & J.E. Nudel: Cyclic nucleotide-induced maturation of human promyelocytic leukemia cells. *J. Clin. Invest.* 70, 953-964, 1982.
- Château, M.-T., H. Rabesandratana & R. Caravano: Differentiated U937 cells and human monocytes exhibit a differential production of extracellular oxygen species: $O_2^{\cdot -}$ excretion versus H_2O_2 diffusion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13, 19-28, 1996.
- Chomczynski, P. & N. Sacchi: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- Clark, J.D., L.-L. Lin, R.W. Kriz, C.S. Ramesha, L.A. Sultzman, Y.A. Lin, N. Milona & J.L. Knopf: A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA_2 contains a Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 65, 1043-1051, 1991.
- Clark, J.D., A.R. Schievella, E.A. Nalefski & L.-L. Lin: Cytosolic phospholipase A_2 . *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12, 83-117, 1995.

Cobb, M.H., T.G. Boulton & D.J. Robbins: Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul.* 2, 965-978, 1991.

Cockcroft, S.: G-protein-regulated phospholipases C, D and A₂-mediated signalling in neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1113, 135-160, 1992.

Cockcroft, S., G.M.H. Thomas, A. Fensome, B. Geny, E. Cunningham, I. Gout, I. Hiles, N.F. Totty, O. Truong & J.J. Hsuan: Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 263, 523-526, 1994.

Cohen, M.S.: Molecular events in the activation of human neutrophils for microbial killing. *Clin. Infect. Dis.* 18 (Suppl. 2), S170-S179, 1994.

Cohen, P.: The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 453-508, 1989.

Cohen, P., C.F.B. Holmes & Y. Tuskitani: Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.* 15, 98-102, 1990.

Coleman, C.N.: Beneficial liaisons: radiobiology meets cellular and molecular biology. *Radiother. Oncol.* 28, 1-15, 1993.

Collins, S.J.: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70, 1233-1244, 1987.

Collins, S.J., A. Bodner, R. Ting & R.C. Gallo: Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells. *Int. J. Cancer* 25, 213-218, 1980.

Collins, S.J., R.C. Gallo & R.E. Gallagher: Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270, 347-349, 1977.

Collins, S.J., F.W. Ruscetti, R.E. Gallagher & R.C. Gallo: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2458-2564, 1978.

Conricode, K.M., K.A. Brewer & J.H. Exton: Activation of phospholipase D by protein kinase C. Evidence for a phosphorylation-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 267, 7199-7202, 1992.

Corey, S., A. Equinoa, K. Puyana-Theall, J.B. Bolen, L. Cantley, F. Mollinedo, T.R. Jackson, P.T. Hawkins & L.R. Stephens: Granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulates both association and activation of phosphoinositide 3OH-kinase and *src*-related tyrosine kinase(s) in human myeloid derived cells. *EMBO J.* 12, 2681-2690, 1993.

Crockett-Torabi, E. & J.C. Fantone: Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fc γ receptor-specific mechanisms. *J. Immunol.* 145, 3026-3032, 1990.

Crooke, S.T.: Progress in antisense therapeutics. *Hematol. Pathol.* 9, 59-72, 1995.

- Cross, A.R. & J.T. Curnutte: The cytosolic activating factors p47^{phox} and p67^{phox} have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 6543-6548, 1995.
- Cross, A.R. & O.T.G. Jones: Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 281-298, 1991.
- Cross, M.J., A. Stewart, M.N. Hodgkin, D.J. Kerr & M.J.O. Wakelam: Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A₂ activity in Swiss 3T3 cells. Wortmannin is not a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 25352-25355, 1995.
- Cui, Y., K. Harvey, L. Akard, J. Jansen, C. Hughes, R.A. Siddiqui & D. English: Regulation of neutrophil responses by phosphotyrosine phosphatase. *J. Immunol.* 152, 5420-5428, 1994.
- Curnutte, J.T.: Activation of human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced (triphosphopyridine nucleotide, reduced) oxidase by arachidonic acid in a cell-free system. *J. Clin. Invest.* 75, 1740-1743, 1985.
- Curnutte, J.T.: Superoxide production by human phagocytes: insights from chronic granulomatous disease. In: *Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*; A.J. Jesaitis & E.A. Dratz, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992, p. 215-223.
- Currie, S., G.L. Smith, C.A. Crichton, C.G. Jackson, C. Hallam & M.J. Wakelam: Bombesin stimulates the rapid activation of phospholipase A₂-catalyzed phosphatidylcholine hydrolysis in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 267, 6056-6062, 1992.
- Dagher, M.C., A. Fuchs, N. Bourmeyster, A. Jouan & P.V. Vignais: Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase. *Biochimie* 77, 651-660, 1995.
- Dalton, Jr. W.T., M.J. Ahearn, K.B. McCredie, E.J. Freireich, S.A. Stass & J.M. Trujillo: NB-4 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71, 242-247, 1988.
- Dana, R., H.L. Malech & R. Levy: The requirement for phospholipase A₂ for activation of the assembled NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem. J.* 297, 217-223, 1994.
- Dang, P.M., J. Hakim & A. Périanin: Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils. *FEBS Lett.* 349, 338-342, 1994.
- Datta, R., D.E. Hallahan, S. Kharbanda, E. Rubin, M.L. Sherman, E. Huberman, R.R. Weichselbaum & D.W. Kufe: Involvement of reactive oxygen intermediates in the activation of c-jun transcription by ionizing radiation. *Biochemistry* 31, 8300-8306, 1992.
- DeChatelet, L.R., G.D. Long, P.S. Shirley, D.A. Bass, M.J. Thomas, F.W. Henderson & M.S. Cohen: Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J. Immunol.* 129, 1589-1593, 1982.

De Chaffoy de Courcelles, D., P. Roevens & H. van Belle: R 59022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J. Biol. Chem.* 260, 15762-15770, 1985.

Dekker, L.V. & P.J. Parker: Protein kinase C - a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 19, 73-77, 1994.

Della Bianca, V., M. Grzeskowiak, M.A. Cassatella, L. Zeni. & F. Rossi: Phorbol 12,myristate 13,acetate potentiates the respiratory burst while inhibits phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 556-565, 1986.

Della Bianca, V., M. Greskowiak, S. Dusi & F. Rossi: Transmembrane signaling pathways involved in phagocytosis and associated activation of NADPH oxidase mediated by FcγRs in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 53, 427-438, 1993.

Devary, Y., C. Rosette, J.A. DiDonato & M. Karin: NF-κB activation by ultraviolet light is not dependent on a nuclear signal. *Science* 261, 1442-1445, 1993.

Dewald, B., M. Thelen, M.P. Wymann & M. Baggiolini: Staurosporine inhibits the respiratory burst and induces the exocytosis in human neutrophils. *Biochem. J.* 264, 879-884, 1989.

Dhand, R., I. Hiles, G. Panayotou, S. Roche, M.J. Fry, I. Gout, N.F. Totty, O. Troung, P. Vicendo, K. Yonezawa, M. Kasuga, S.A. Courtneidge & M.D. Waterfield: PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J.* 12, 522-533, 1994.

Didsbury, J., R.F. Weber, G.M. Bokosch, T. Evans & R. Snyderman: *Rac*, a novel *ras*-related family of proteins that are Botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264, 16378-16382, 1989.

Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A.W. Segal & A. Hall: Interaction of *Rac* with p67^{phox} and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265, 531-533, 1994.

Ding, J. & J.A. Badwey: Effects of antagonists of protein phosphatases on superoxide release by neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267, 6442-6448, 1992.

Ding, J. & J.A. Badwey: Neutrophils stimulated with a chemotactic peptide or a phorbol ester exhibit different alterations in the activities of a battery of protein kinases. *J. Biol. Chem.* 268, 5234-5240, 1993.

Ding, J. & J.A. Badwey: Stimulation of neutrophils with a chemoattractant activates several novel protein kinases that can catalyze the phosphorylation of peptides derived from the 47-kDa protein component of the phagocyte oxidase and myristoylated alanine-rich C kinase substrate. *J. Biol. Chem.* 268, 17326-17333, 1993a.

Djerdjouri, B., E. Pedruzzi, J. Hakim & A. Périanin: Okadaic acid, an inhibitor of type 1 and type 2A phosphatases, modulates the activation of phospholipase D in formyl peptide- and mastoparan-stimulated human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 1481-1487, 1994.

Djerdjouri, B., C. Combadière, E. Pedruzzi, J. Hakim & A. Périanin: Contrasting effects of calyculin and okadaic acid on the respiratory burst of human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 288, 193-200, 1995.

Dobrowsky, R.T. & Y.A. Hannun: Ceramide-activated protein phosphatase: partial purification and relationship to protein phosphatase 2A. *Adv. Lipid Res.* 25, 91-104, 1993.

Dobrowsky, R.T., C. Kamibayashi, M.C. Mumby & Y.A. Hannun: Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 268, 15523-15530, 1993.

Downey, G.P., T. Fukushima, L. Fialkow & T.K. Waddell: Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. *Sem. Cell Biol.* 6, 345-356, 1995.

Drexler, H.G., H. Quentmeier, R.A.F. MacLeod, C.C. Uphoff & Z.-B. Hu: Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia Res.* 19, 681-691, 1995.

Dufer, J., D. Biakou, P. Joly, H. Benoist, Y. Carpentier & A. Desplaces: Quantitative morphological aspects of granulocytic differentiation induced in HL-60 cells by dimethylsulfoxide and retinoic acid. *Leukemia Res.* 13, 621-627, 1989.

Durden, D.L. & Y.B. Liu: Protein-tyrosine kinase p72^{syk} in Fc gamma RI receptor signaling. *Blood* 84, 2102-2108, 1994.

Durden, D.L., H. Rosen, B.R. Michel & J.A. Cooper: Protein tyrosine phosphatase inhibitors block myeloid signal transduction through the Fc gamma RI receptor. *Exp. Cell Res.* 211, 150-162, 1994.

Durden, D.L., H. Rosen & J.A. Cooper: Serine/threonine phosphorylation of the gamma-subunit after activation of the high-affinity Fc receptor for immunoglobulin G. *Biochem. J.* 299, 569-577, 1994a.

Durden, D.L., H. M. Kim, B. Calore & Y. Liu: The FcγRI receptor signals through the activation of *hck* and MAP kinase. *J. Immunol.* 154, 4039-4047, 1995.

Dusi, S., V. Della-Bianca, M. Grzeskowiak & F. Rossi: Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47^{phox} and p67^{phox} and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca²⁺-depleted human neutrophils. *Biochem. J.* 290, 173-178, 1993.

Dyballa, S.: Die Wirkung ionisierender Strahlung auf die Expression differenzierungsabhängiger Zellmembranantigene bei der promyelozytären HL-60 Zelllinie. Dissertation, Medizin. Fakultät der Technischen Universität München, 1995, p. 1-77.

Eberle, M., A.E. Traynor-Kaplan, L.A. Sklar & J. Norgauer: Is there a relationship between phosphatidylinositol trisphosphate and the F-actin polymerization in human neutrophils? *J. Biol. Chem.* 265, 16725-16728, 1990.

Edashige, K., E.F. Sato, K. Akimaru, M. Kasai & K. Utsumi: Differentiation of HL-60 cells by phorbol ester is correlated with up-regulation of protein kinase C-α. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 200-205, 1992.

Edberg, J.C. & R.P. Kimberly: Modulation of Fc gamma and complement receptor function by the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of Fc gamma RIII. *J. Immunol.* 152, 5826-5835, 1994.

Edwards, S.W.: Luminol- and lucigenin-dependent chemoluminescence of neutrophils: Role of degranulation. *J. Clin. Lab. Immunol.* 22, 35-39, 1987.

Edwards, S.W.: Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge University Press, 1994, p. 1-299.

El Benna, J., L.P. Faust & B.M. Babior: The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47^{phox} during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J. Biol. Chem.* 269, 23431-23436, 1994.

Emmendorfer, A., M. Hecht, M.L. Lohmann-Matthes & J. Roesler: A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Methods* 131, 269-275, 1990.

English, D. & G.S. Taylor: Divergent effects of propranolol on neutrophil superoxide release: involvement of phosphatidic acid and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 423-429, 1991.

Erman, A., R. Azuri & A. Raz: Phospholipase A₂ inhibitors. Differential inhibition of fatty acid acylation into kidney lipids by mepacrine and p-bromophenacyl bromide. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2083-2087, 1983.

Exley, M., L. Varticovski, M. Peter, J. Sancho & C. Terhorst: Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J. Biol. Chem.* 269, 15140-15146, 1994.

Exton, J.H.: Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 26-42, 1994.

Fanger, M.W., L. Shen, R.F. Graziano & P.M. Guyre: Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today* 10, 92-99, 1989.

Fantone, J.C. & P.A. Ward: Oxygen-derived radicals: Relationship to tissue injury. *Curr. Concepts (Upjohn Comp., Kalamazoo, MI, USA)*, 1985, p. 4-51.

Fantus, I.G., S. Kadota, G. Deragon, B. Foster & B.I. Posner: Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocytes via activation of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* 28, 8864-8871, 1989.

Farahi Far, D., J.-F. Peyron, V. Imbert & B. Rossi: Immunofluorescent quantification of tyrosine phosphorylation of cellular proteins in whole cells by flow cytometry. *Cytometry* 15, 327-334, 1994.

Farber, J.L., M.E. Kyle & J.B. Coleman: Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* 62, 670-679, 1990.

Farzaneh, F., R. Meldrum & S. Shall: Transient formation of DNA strand breaks during induced differentiation of a human promyelocytic leukaemic cell line, HL-60. *Nucleic Acids Res.* 15, 3493-3502, 1987.

Farzaneh, F., S. Feon, R.A. Lebbby, D. Brill, J.-C. David & S. Shall: DNA repair in human promyelocytic cell line, HL-60. *Nucleic Acids Res.* 15, 3503-3513, 1987a.

Fialkow, L., C.K. Chan, S. Grinstein & G.P. Downey: Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase. Role of reactive oxygen metabolites. *J. Biol. Chem.* 268, 17131-17137, 1993.

Fibach, E., T. Pleled, T. Fibach & E.A. Rachmilewitz: Isolation and characterization of HL-60 cell variants with different potentials for spontaneous differentiation. *Leukemia* 5, 912-916, 1991.

Filippov, A., G. Skatova, V. Porotikov, E. Kobrinski & M. Saxon: Ca^{2+} -antagonistic properties of phospholipase A_2 inhibitors, mepacrine and chloroquine. *Gen. Physiol. Biophys.* 8, 113-118, 1989.

Fischkoff, S.A., A. Pollak, G.J. Gleich, J.R. Testa, S. Misawa & T.J. Reber: Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *J. Exp. Med.* 160, 179-196, 1984.

Fischkoff, S.A., M.C. Hoessly & R.M. Rossi: Characterization of sublines of HL-60 human leukemia cells resistant to induction of differentiation by butyric acid. *Leukemia* 4, 302-306, 1990.

Fisher, G.J., P.A. Henderson, J.J. Voorhees & J.J. Baldassare: Epidermal growth factor-induced hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase D and phospholipase C in human dermal fibroblasts. *J. Cell Physiol.* 146, 309-317, 1991.

FitzGerald, T.J., M. McKenna, K. Kase, C. Daugherty, L. Rothstein & J.S. Greenberger: Effect of X-irradiation dose rate on the clonogenic survival of human and experimental animal hematopoietic tumor cell lines: evidence for heterogeneity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 12, 69-73, 1986.

Fontana, J.A., D.G. Wright, E. Schiffman, B.A. Corcoran & A.B. Deisseroth: Development of chemotactic responsiveness in myeloid precursor cells: studies with a human leukemia cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3664-3668, 1980.

Fry, M.J.: Structure, regulation and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1226, 237-268, 1994.

Frye, R.A.: Involvement of G proteins, cytoplasmic calcium, phospholipases, phospholipid-derived second messengers, and protein kinases in signal transduction from mitogenic cell surface receptors. *Cancer Treatm. Res.* 63, 281-299, 1992.

Fukazawa, H., P.M. Li, C. Yamamoto, Y. Murakami, S. Mizuno & Y. Uehara: Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1661-1671, 1991.

Fuks, Z., A. Haimovitz-Friedman & R.N. Kolesnick: The role of the sphingomyelin pathway and protein kinase C in radiation-induced cell kill. In: *Important Advances in*

Oncology (V.T. DeVita, S. Hellman & S.A. Rosenberg, eds.), J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1995, p. 19-31.

Gallin, J.I.: Neutrophil specific granules: a fuse that ignites the inflammatory response. *Clin. Res.* 32, 320-328, 1984.

Gallin, E.K., S.W. Green & J. Darden: Defective Fc-mediated phagocytosis in γ -irradiated mouse peritoneal macrophages. *Int. J. Radiat. Biol.* 45, 459-467, 1984.

Garcia, R.C., M. Whitaker, P.G. Heyworth & A.W. Segal: Okadaic acid produces changes in phosphorylation and translocation of proteins and in intracellular calcium in human neutrophils. Relationship with the activation of the NADPH oxidase by different stimuli. *Biochem. J.* 286, 687-692, 1992.

Garland, L.G.: New pathways of phagocyte activation: the coupling of receptor-linked phospholipase D and the role of tyrosine kinase in primed neutrophils. *FEMS Microbiol. Immunol.* 105, 229-238, 1992.

Gatti, R.A., E. Boder, H.V. Vinters, R.S. Sparkes, A. Norman & K. Lange: Ataxia telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine-Baltimore* 70, 99-117, 1991.

Gay, J.C. & J.J. Murray: Differential effects of propranolol on responses to receptor-dependent and receptor-independent stimuli in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1095, 236-242, 1991.

Gélas, P., V. von Tscharner, M. Record, M. Baggiolini & H. Chap: Human neutrophil phospholipase D activation by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine reveals a two-step process for the control of phosphatidylcholine breakdown and oxidative burst. *Biochem. J.* 287, 67-72, 1992.

Goin, M., O. Pignataro & L. Jimenez-de-Asua: Early cell cycle diacylglycerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activity enhancement potentiates prostaglandin F_2 α (PGF_2 α) induced mitogenesis in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett.* 316, 68-72, 1993.

Goodman, E.B. & A.J. Tenner: Signal transduction mechanisms of $C1_q$ -mediated superoxide production. Evidence for the involvement of temporally distinct staurosporine-insensitive and sensitive pathways. *J. Immunol.* 148, 3920-3928, 1992.

Gratas, C. & G. Powis: Inhibition of phospholipase D by agents that inhibit cell growth. *Anticancer Res.* 13, 1239-1244, 1993.

Greenberg, S.: Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol.* 5, 93-99, 1995.

Grignani, F., M. Fagioli, M. Alcalay, L. Longo, P.P. Pandolfi, E. Donti, A. Biondi, F. Lo Coco, F. Grignani & P.G. Pelicci: Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 83, 10-25, 1994.

Grilli, G., W. Nothdurft & T.M. Flidner: Radiation sensitivity of human erythropoietic and granulopoietic progenitor cells in the blood and in the bone marrow. *Int. J. Radiat. Biol.* 41, 685-687, 1982.

Grinstein, S. & W. Furuya: Tyrosine phosphorylation and oxygen consumption induced by G proteins in neutrophils. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 29)* 260, C1019-C1027, 1990.

Grinstein, S., W. Furuya, D.J. Lu & G.B. Mills: Vanadate stimulates oxygen consumption and tyrosine phosphorylation in electropermeabilized neutrophils. *J. Biol. Chem.* 265, 318-327, 1990.

Grinstein, S., J.R. Butler, W. Furuya, G. L'Allemain & G.P. Downey: Chemotactic peptides induce phosphorylation and activation of MEK-1 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 269, 19313-19320, 1994.

Goldstein, I.M., D. Roos, H.B. Kaplan & G. Weissmann: Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. *J. Clin. Invest.* 56, 1155-1163, 1975.

Grunicke, H.: Signal transduction inhibitors. *Eur. J. Cancer* 31A, 833-834, 1995.

Haimovitz-Friedman, A., C.-C. Kan, D. Ehleiter, R.S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks & R.N. Kolesnick: Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J. Exp. Med.* 180, 525-535, 1994.

Haimovitz-Friedman, A., N. Balaban, M. McLoughlin, D. Ehleiter, J. Michaeli, I. Vlodavsky & Z. Fuks: Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 54, 2591-2597, 1994a.

Hall, E.J., *Radiobiology for the Radiologist*. (4th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia), 1994, 1-478.

Hall, P.A., D.A. Levison, A.L. Woods, C.C. Yu, D.B. Kellock, J.A. Watkins, D.M. Barnes, C.E. Gilett, R. Camplejohn, R. Dover, N.H. Waseem & D.P. Lane: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 162, 285-294, 1990.

Hallahan, D.E., D.R. Spriggs, M.A. Beckett, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: Increased tumor necrosis factor α mRNA after cellular exposure to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10104-10107, 1989.

Hallahan, D.E., S. Virudachalam, M.L. Sherman, E. Huberman, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: Tumour necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res.* 51, 4565-4569, 1991.

Hallahan, D.E., V.P. Sukhatme, M.L. Sherman, S. Virudachalam, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: Protein kinase-C mediates X-ray inducibility of nuclear signal transducers, *egr-1* and *c-jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2152-2160, 1991a.

Hallahan, D.E., S. Virudachalam, M. Beckett, M.L. Sherman, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: Mechanisms of X-ray-mediated protooncogene *c-jun* expression in radiation-induced human sarcoma cell lines. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21, 1677-1681, 1991b.

Hallahan, D.E., S. Virudachalam, D. Grdina & R.R. Weichselbaum: The isoquinoline sulfonamide H-7 attenuates radiation-mediated protein kinase C activation and delays the onset of X-ray-induced G₂ arrest. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24, 687-692, 1992.

Hallahan, D.E., S. Virudachalam, J.L. Schwartz, N. Panje, R. Mustafi & R.R. Weichselbaum: Inhibition of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 129, 345-350, 1992a.

Hallahan, D.E., S. Virudachalam, J. Kuchibhotla, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: Membrane-derived second messenger regulates X-ray-mediated tumor necrosis factor α gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4897-4901, 1994.

Hallahan, D.E., S. Virudachalam, J. Kuchibhotla, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: Ketoconazole attenuates radiation-induction of tumor necrosis factor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29, 777-780, 1994a.

Hallahan, D.E., D. Bleakman, S. Virudachalam, D. Lee, D. Grdina, D.W. Kufe & R.R. Weichselbaum: The role of intracellular calcium in the cellular response to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 138, 392-400, 1994b.

Hamada, F., M. Aoki, T. Akiyama & K. Toyoshima: Association of immunoglobulin G Fc receptor II with *Src*-like protein-tyrosine kinase *Fgr* in neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6305-6309, 1993.

Hanks, J.H. & R.E. Wallace: Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71, 196-200, 1949.

Hannun, Y.A.: The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* 269, 3125-3128, 1994.

Hasan, N.M., P.J. Parker & G.E. Adams: Induction and phosphorylation of protein kinase C- α and mitogen-activated protein kinase by hypoxia and by radiation in Chinese hamster V79 cells. *Radiat. Res.* 145, 128-133, 1996.

Hawkins, P.T., T.R. Jackson & L.R. Stephens: Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P₃ by activating a PtdIns(4,5)P₂ 3-OH kinase. *Nature* 358, 157-159, 1992.

Hecker, E.: Structure-activity relationship in diterpene esters irritant and cocarcinogenic to mouse skin. In: *Carcinogenesis, Vol. 2: Mechanisms of Tumor Promotion and Cocarcinogenesis* (T.J. Slaga et al., eds.), Raven Press, New York, 1978, p. 11-48.

Heldin, C.-H.: Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223, 1995.

Henderson, L.M. & J.B. Chappell: Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?. *Eur. J. Biochem.* 217, 973-980, 1993.

Henderson, L.M., S.K. Moule & J.B. Chappell: The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 211, 157-162, 1993.

Henson, P.M.: Interaction of cells with immune complexes: adherence, release of constituents and tissue injury. *J. Exp. Med.* 134 (Suppl.), 114s, 1971.

Heung, Y.M.M. & A.D. Postle: The molecular selectivity of phospholipase D in HL-60 granulocytes. *FEBS Lett.* 364, 250-254, 1995.

Hidaka, H., M. Inagaki, S. Kawamoto & Y. Sasaki: Isoquinoline sulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23, 5036-5041, 1984.

Hinshaw, D.B. & J.M. Burger: Protective effect of glutamine on endothelial cell ATP in oxidant injury. *J. Surg. Res.* 49, 222-227, 1990.

Hoffmeyer, F., K. Witte, U. Gebhardt & R.E. Schmidt: The low affinity FcγRIIa and FcγRIIb on poly-morphonuclear neutrophils are differentially regulated by CD45 phosphatase. *J. Immunol.* 155, 4016-4023, 1995.

Hofmann, S.L., S.M. Prescott & P.W. Majerus: The effects of mepacrine and p-bromophenylacetyl bromide on arachidonic acid release in human platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 215, 237-244, 1982.

Hogg, N.: The structure and function of Fc receptors. *Immunol. Today* 9, 185-187, 1988.

Holmes, B., A.R. Page & R.A. Good: Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocyte function. *J. Clin. Invest.* 46, 1422-1432, 1967.

Holmes, B., P.G. Quie, D.B. Windhorst & R.A. Good: Fatal granulomatous disease of childhood: An inborn abnormality of phagocyte function. *Lancet* i, 1225-1228, 1966.

Houldsworth, J. & M.F. Lavin: Effect of ionizing radiation on DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nucleic Acids Res.* 8, 3709-3720, 1980.

Howard, T.H. & W.H. Meyer: Chemotactic peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *J. Cell Biol.* 98, 1265-1271, 1984.

Howard, T.H. & C.O. Oresajo: A method for quantifying F-actin in chemotactic peptide activated neutrophils: study of the effect of tBOC peptide. *Cell. Motil.* 5, 545-557, 1985.

Howard, T.H. & C.O. Oresajo: The kinetics of chemotactic peptide-induced change in F-actin content, F-actin distribution, and the shape of neutrophils. *J. Cell Biol.* 101, 1078-1085, 1985a.

Howe, R.S., S.A. Fischkoff, R.M. Rossi & C.R. Lytle: Chemotactic capabilities of HL-60 human myeloid leukemia cells differentiated to eosinophils. *Exp. Hematol.* 18, 299-303, 1990.

Hug, H. & T.F. Sarre: Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem. J.* 291, 329-343, 1993.

Huizinga, T.W.J., F. van Kemenade, L. Koenderman, K.M. Dolman, A.E.G. Kr. von dem Borne, P.A.T. Tetteroo & D. Roos: The 40-kDa Fcγ receptor (FcγRII) on human neutrophils

is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis. *J. Immunol.* 142, 2365-2369, 1989.

Hundt, M. & R.E. Schmidt: The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 22, 811-816, 1992.

Hundt, M. & R.E. Schmidt: The GPI-anchored Fc gamma receptor III in the activation of granulocytes. *Immun. Infekt.* 20, 89-90, 1992a.

Hunter, T.: Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236, 1995.

Hunter, T.: When is a lipid kinase not a lipid kinase? When it is a protein kinase. *Cell* 83, 1-4, 1995a.

Hutt-Taylor, S.R., D. Harnish, M. Richardson, T. Ishizaka & J.A. Denburg: Sodium butyrate and a T lymphocyte cell line-derived differentiation factor induce basophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Blood* 71, 209-215, 1988.

Ikegami, Y., S. Yano, K. Nakao, F. Fujita, Y. Sakamoto, N. Murata & K. Isowa: Antitumor activity of the new selective protein kinase C inhibitor 4'-N-benzoyl staurosporine on murine and human tumor models. *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 45 (II), 1225-1230, 1995.
Ingalls, R.R. & D.T. Golenbock: CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 181, 1473-1479, 1995.

Isberg, R.R. & G. Tran Van Nhieu: The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol.* 5, 120-124, 1995.

Jackson, J.H. & C.G. Cochrane: Leukocyte-induced tissue injury. In: *Phagocytic Defects II: Abnormalities of the Respiratory Burst*. J.T. Curnutte, ed.; Hematol. Oncol. Clin. North Am. 2, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, USA, 1988, p. 317-334.

Janeczek, A.H., W.A. Marasco, P.J. van Alten & R.J. Walter: Autoradiographic analysis of formylpeptide chemoattractant binding, uptake and intracellular processing by neutrophils. *J. Cell Sci.* 94, 155-168, 1989.

Jesaitis, A.J., R.W. Erickson, K.-N. Klotz, R.K. Bommakanti & D.W. Siemsen: Functional molecular complexes of human N-formyl chemoattractant receptors and actin. *J. Immunol.* 151, 5653-5665, 1993.

Johansson, A., A.J. Jesaitis, H. Lundquist, K.-E. Magnusson, C. Sjölin, A. Karlsson & C. Dahlgren: Different subcellular localization of cytochrome b and the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: Effects on the production of reactive oxygen species during phagocytosis. *Cell. Immunol.* 161, 61-71, 1995.

Johansson, A., E. Särndahl, T. Andersson, T. Bengtsson, H. Lundqvist & C. Dahlgren: Chemoattractant-induced NADPH oxidase activity in human monocytes is terminated without any association of receptor-ligand complex to cytoskeleton. *Inflammation* 19, 179-191, 1995a.

Kaffenberger, W. & D. van Beuningen: Differences in radiosensitivity of the respiratory burst generated in HL-60 cells via different signal transduction pathways. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 767-774, 1994.

Kaffenberger, W., B.P.E. Clasen & D. van Beuningen: The respiratory burst of neutrophils, a prognostic parameter in head and neck cancer? *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64, 57-62, 1992.

Kaffenberger, W., L. Hölzer-Müller, T. Auberger, B.P.E. Clasen, G. Hohlmeier & D. van Beuningen: An immunological outcome predictive score for head and neck carcinoma patients. *Strahlenther. Onkol.* 171, 444-453, 1995.

Kaffenberger, W., E. Kreuzfelder & R.U. Peter: Immunological abnormalities in Chernobyl accident patients with cutaneous radiation damage: effects of low dose treatment with interferon-gamma. In: *Advances in the Treatment of Radiation Injuries* (T.J. MacVittie, J.F. Weiss & D. Browne; eds.), Pergamon, Elsevier Science, 1996, p. 249-259.

Kapeller, R. & L.C. Cantley: Phosphatidylinositol 3-kinase. *BioEssays* 16, 565-576, 1994.

Karimi, K. & M.R. Lennartz: Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* 155, 5786-5794, 1995.

Kessels, C.C., D. Roos, A.J. Verhoeven: fMet-Leu-Phe-induced activation of phospholipase D in human neutrophils. Dependence on changes in cytosolic free Ca^{2+} concentration and relation with respiratory burst activation. *J. Biol. Chem.* 266, 23152-23156, 1991.

Kew, R.R., C.M. Grimaldi, M.B. Furie & H.B. Fleit: Human neutrophil $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ and formyl peptide receptors are functionally linked during formyl-methionyl-leucyl-phenyl-alanine-induced chemotaxis. *J. Immunol.* 149, 989-997, 1992.

Keyse, S.M.: The induction of gene expression in mammalian cells by radiation. *Sem. Cancer Biol.* 4, 119-128, 1993.

Khan, A.U. & T. Wilson: Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem. & Biol.* 2, 437-445, 1995.

Khan, W.A., G.C. Blobe & Y.A. Hannun: Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell. Signal.* 7, 171-184, 1995.

Kharbanda, S., R. Rao, P. Pandey, T.D. Shafman, S.M. Feller, R.R. Weichselbaum & D.W. Kufe: Activation of the *c-Abl* tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 376, 785-788, 1995.

Kharbanda, S., A. Saleem, T.D. Shafman, Y. Emoto, N. Taneja, E. Rubin, R.R. Weichselbaum, J. Woodgett, J. Avruch, J. Kyriakis & D.W. Kufe: Ionizing radiation stimulates a Grb2-mediated association of the stress-activated protein kinase with phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 18871-18874, 1995a.

Khosravi-Far, R. & C.J. Der: The *Ras* signal transduction pathway. *Cancer Metast. Rev.*, 13, 67-89, 1994.

Kim, C.Y., A.J. Giaccia, B. Strulovici & J.M. Brown: Differential expression of protein kinase C epsilon protein in lung cancer cell lines by ionising radiation. *Br. J. Cancer* 66, 844-849, 1992.

Kim, B.Y., S.C. Ahn, H.K. Oh, H.S. Lee, T.I. Mheen, H.M. Rho & J.S. Ahn: Inhibition of PDGF-induced phospholipase D but not phospholipase C activation by herbimycin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 1061, 1067, 1995.

Kinsey, B.M., A.I. Kassis, F. Fayad, W.W. Layne & S.J. Adelstein: Synthesis and biological studies of iodinated derivatives of rhodamine 123. *J. Med. Chem.* 30, 1757-1761, 1987.

Kirchgessner, C.U., C.K. Patil, J.W. Evans, C.A. Cuomo, L.M. Fried, T. Carter, M.A. Oettinger & J.M. Brown: DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267, 1178-1183, 1995.

Kishimoto, T., T. Taga & S. Akira: Cytokine signal transduction. *Cell* 76, 253-262, 1994.

Knaus, U.G., P.G. Heyworth, T. Evans, J.T. Curnutte & G.M. Bokosch: Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254, 1512-1515, 1991.

Kobayashi, K., K. Takahashi & S. Nagasawa: The role of tyrosine phosphorylation and Ca^{++} accumulation in Fc γ -receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils. *J. Biochem.* 117, 1156-1161, 1995.

Koeffler, H.P.: Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells: therapeutic implications. *Blood* 62, 709-721, 1983.

Kolesnick, R.N., A. Haimovitz-Friedman & Z. Fuks: The sphingomyelin signal transduction pathway mediates apoptosis for tumor necrosis factor, *Fas*, and ionizing radiation. *Biochem. Cell Biol.* 72, 417-474, 1994.

Kooy, N.W., J.A. Royall, H. Ischiropoulos & J.S. Beckman: Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biol. & Med.* 16, 149-156, 1994.

Kozawa, O., A. Suzuki, J. Shinoda & Y. Oiso: Genistein inhibits potentiation by wortmannin of protein kinase C-activated phospholipase D in osteoblast-like cells. *Cell. Signal.* 7, 219-223, 1995.

Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* 66, 188-193, 1975.

Lam, K., C.L. Carpenter, N.B. Ruderman, J.C. Friel & K.L. Kelly: The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by wortmannin. *J. Biol. Chem.* 269, 20648-20652, 1994.

Lambeth, J.D.: Activation of the respiratory burst oxidase in neutrophils: On the role of membrane-derived second messengers, Ca^{++} , and protein kinase C. *J. Bioenerget. Biomembr.* 20, 709-733, 1988.

Landberg, G. & G. Roos: Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in human malignant hematopoietic cells. *Acta Oncol.* 30, 917-921, 1991.

Laver, J., W. Ebell & H. Castro-Malaspina: Radiobiological properties of the human hematopoietic microenvironment: contrasting sensitivities of proliferative capacity and hematopoietic function to in vitro irradiation. *Blood* 67, 1090-1097, 1986.

Laver, J., J.-H. Kwon & H. Castro-Malaspina: Effects of low dose rate irradiation on human marrow hematopoietic and microenvironmental cells: sparing effect upon survival of stromal and leukemic cells. *Bone Marrow Transplant.* 2, 271-278, 1987.

Leach, K.L., Ruff, V.A., T.M. Wright, M.S. Pessin & D.M. Raben: Dissociation of protein kinase C activation and sn-1,2-diacylglycerol formation. Comparison of phosphatidylinositol- and phosphatidyl-choline-derived diglycerides in alpha-thrombin-stimulated fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266, 3215-3221, 1991.

Lee, Y.H., H.S. Kim, J.-K. Pai, S.H. Ryu & P.-G. Suh: Activation of phospholipase D induced by platelet-derived growth factor is dependent upon the level of phospholipase C- γ_1 . *J. Biol. Chem.* 269, 26842-26847, 1994.

Lees-Miller, S.P., R. Godbout, D.W. Chan, M. Weinfeld, R.S. Day, G.M. Barron & J. Allalunis-Turner: Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science* 267, 1183-1185, 1995.

Leglise, M.C., G.A. Dent, L.H. Ayscue & D.W. Ross: Leukemic cell maturation: Phenotypic variability and oncogene expression in HL-60 cells: a review. *Blood Cells* 13, 319-337, 1988.

Lehnert, S., W.B. Rybka, S. Suissa & D. Giambattisto: Radiation response of haematopoietic cell lines of human origin. *Int. J. Radiat. Biol.* 49, 423-431, 1986.

Leung, M.-F., T.S. Lin & A.C. Sartorelli: Changes in actin and actin-binding proteins during the differentiation of HL-60 leukemia cells. *Cancer Res.* 52, 3063-3066, 1992.

Levy, R., D. Rotrosen, O. Nagauker, T.L. Leto & H.L. Malech: Induction of the respiratory burst in HL-60 cells. Correlation of function and protein expression. *J. Immunol.* 145, 2595-2601, 1990.

Liao, F., H.S. Shin & S.G. Rhee: Tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ_1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3659-3663, 1992.

Lin, L.-L., A.Y. Lin & J.L. Knopf: Cytosolic phospholipase A₂ is coupled to the hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6147-6151, 1992.

Lin, L.-L., M. Wartmann, A.Y. Lin, J.L. Knopf, A. Seth & R.J. Davis. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72, 269-278, 1993.

Lin, C.-T., Z. Shen, P. Boros & J.C. Unkeless: Fc receptor-mediated signal transduction. *J. Clin. Immunol.* 14, 1-13, 1994.

Liscovitch, M.: Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends Biochem. Sci.* 17, 393-399, 1992.

Liscovitch, M., V. Chalifa, P. Pertile, C.-S. Chen & L.C. Cantley: Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 269, 21403-21406, 1994.

Lister, M.D., K.B. Glaser, R.J. Ulevitch & E.A. Dennis: Inhibition studies on the membrane-associated phospholipase A₂ in vitro and prostaglandin E₂ production in vivo of the macrophage-like P388D1 cell. Effects of manolide, 7,7-dimethyl-5,8-eicosadienic acid, and p-bromophenacyl bromide. *J. Biol. Chem.* 264, 8520-8528, 1989.

Lord, J.M. & J. Pongracz: Protein kinase C: a family of isoenzymes with distinct roles in pathogenesis. *Clin. Mol. Pathol.* 48, M57-M64, 1995.

Lotem, J. & L. Sachs: Potential pre-screening for therapeutic agents that induce differentiation in human myeloid leukemia cells. *Int. J. Cancer* 25, 561-564, 1980.

Lu, D.J., W. Furuya & S. Grinstein: Involvement of multiple kinases in neutrophil activation. *Blood Cells* 19, 343-351, 1993.

Lu, D.J., A. Takai, T.L. Leto & S. Grinstein: Modulation of neutrophil activation by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. *Am. J. Physiol.* 262 (Cell Physiol. 31), C39-C-49, 1992.

Lund-Johansen, F. & J. Olweus: Signal transduction in monocytes and granulocytes by multiparameter flow cytometry. *Cytometry* 13, 693-702, 1992.

Majumdar, S., M.W. Rossi, T. Fujiki, W.A. Phillips, S. Disa, C.F. Queen, R.B. Johnston, Jr., O.M. Rosen, B.E. Corkey & H.M. Korchak: Protein kinase C isotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable, calcium- and phospholipid-dependent β -protein kinase C and a novel calcium-independent, phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* 266, 9285-9294, 1991.

Majumdar, S., L.H. Kane, M.W. Ross, B.D. Volpp & W.M. Nauseef & H.M. Korchak: Protein kinase C isoenzymes and signal-transduction in human neutrophils: Selective substrate specificity of calcium-depleted β -PKC and novel calcium-independent nPKC. *Biochim. Biophys. Acta* 1176, 276-286, 1993.

Maly, F.E. & C.C. Schürer-Maly: How and why cells make superoxide: the "phagocytic" NADPH oxidase. *NIPS* 10, 233-238, 1995.

Maridonneau-Parini, I., S.M. Tringale & A.I. Tauber: Identification of distinct activation pathways of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J. Immunol.* 137, 2925-2929, 1986.

Maroney, A.C. & I.G. Macara: Phorbol ester-induced translocation of diacylglycerol kinase from the cytosol to the membrane in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 264, 2537-2544, 1989.

- Marshall, C.J.: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185, 1995.
- Martin, S.J. & T.G. Cotter: Ultraviolet B irradiation of human leukaemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 1001-1016, 1991.
- Martin, M., P. Pinton, F. Crechet, J.-L. Lefaix & F. Daburon: Preferential induction of *c-fos* versus *c-jun* protooncogene during the immediate early response of pig skin to γ -rays. *Cancer Res.* 53, 3246-3249, 1993.
- Matzner, Y., R. Gavison, E.A. Rachmilewitz & E. Fibach: Expression of granulocytic functions by leukemic promyelocytic HL-60 cells: differential induction by dimethylsulfoxide and retinoic acid. *Cell Different.* 21, 261-269, 1987.
- McCord, J.M.: Superoxide production and human disease. In: *Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*; A.J. Jesaitis & E.A. Dratz, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992, p. 225-239.
- McPhail, L.C., P.S. Shirley, C.C. Clayton & R. Snyderman: Activation of the respiratory burst enzyme from human neutrophils in a cell-free system. Evidence for a soluble cofactor. *J. Clin. Invest.* 75, 1735-1739, 1985.
- McPhail, L.C., D. Qualliotine-Mann, D.E. Agwu & C.E. McCall: Phospholipases and activation of the NADPH oxidase. *Eur. J. Haematol.* 51, 294-300, 1993.
- Meier, B., A.J. Jesaitis, A. Emmendorfer, J. Roesler & M.T. Quinn: The cytochrome b-558 molecules involved in the fibroblast and polymorphonuclear leucocyte superoxide-generating NADPH oxidase systems are structurally and genetically distinct. *Biochem. J.* 289, 481-486, 1993.
- Meshulam, T., M.M. Billah, S. Eckel, K.K. Griendling, & R.D. Diamond: Relationship of phospholipase C- and phospholipase D-mediated phospholipid remodeling pathways to respiratory burst activation in human neutrophils stimulated by *Candida albicans* hyphae. *J. Leukoc. Biol.* 57, 842-850, 1995.
- Meyer, T., U. Regenass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rosel, M. Muller, G. Caravatti & A. Matter: A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro antiproliferative as well as in vivo antitumor activity. *Int. J. Cancer* 43, 851-856, 1989.
- Milas, L. & W.R. Hanson: Eicosanoids and radiation. *Eur. J. Cancer* 31A, 1580-1585, 1995.
- Mitsuyama, T., K. Takeshige & S. Minakami: Tyrosine phosphorylation is involved in the respiratory burst of electroporabilized human neutrophils at a step before diacylglycerol formation by phospholipase C. *FEBS Lett.* 322, 280-284, 1993.
- Mohan, N. & M.L. Meltz: Induction of nuclear factor κ B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. *Radiat. Res.* 140, 97-104, 1994.

Morel, F., J. Doussiere & P.V. Vignais: The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. - Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* 201, 523-546, 1991.

Morishita, K., N. Kubota, S. Asano, Y. Kaziro & S. Nagata: Molecular cloning and characterization of cDNA for human myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* 262, 3844-3851, 1987.

Moulder, J.E., P.S. Lo & J.J. Fischer: Effect of combined metronidazol and DMSO on tumor control and skin tolerance in the rat. *Br. J. Cancer, Suppl.* 37, 216-219, 1978.

Mullmann, T.J., B. Cheewatrakoolpong, J.C. Anthes, M.I. Siegel, R.W. Egan & M.M. Billah: Phospholipase C and phospholipase D are activated independently of each other in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 53, 630-635, 1993.

Naccache, P.H., A.C. Caon, C. Gilbert, M. Gaudry, C.J. Roberge, P.E. Poubelle & S. Bourgoin: Inhibition of tyrosine phosphorylation by wortmannin in human neutrophils. Dissociation from its inhibitory effects on phospholipase D. *Lab. Invest.* 69, 19-23, 1993.

Nahum, A., M. Hegarty, H. Chen, W. Chamberlin & J.I. Sznajder: Effect of sodium azide on hydrogen peroxide production by zymosan-activated human neutrophils. *Inflammation* 14, 285-296, 1990.

Nakamura, H., K. Hirata, K. Yamashiro, K. Hiranuma, K. Shibata, K. Higashi, T. Morita & H. Hirano: Increase of hepatic mRNAs of profilin, actin and extracellular matrix proteins after carbon tetrachloride treatment and partial hepatectomy in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 568-573, 1994.

Nakamura, Y., S. Nakashima, K. Ojio, Y. Banno, H. Miyata & Y. Nozawa: Ceramide inhibits IgE-mediated activation of phospholipase D, but not of phospholipase C, in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J. Immunol.* 156, 256-262, 1996.

Nakanishi, H., K.A. Brewer & J.H. Exton: Activation of the zeta isoenzyme of the protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268, 13-16, 1993.

Nakanishi, S., H. Yano & Y. Matsuda: Novel functions of phosphatidylinositol 3-kinase in terminally differentiated cells. *Cell. Signal.* 7, 545-557, 1995.

Nath, J., A. Powledge & D.G. Wright: Studies of signal transduction in the respiratory burst-associated stimulation of fMet-Leu-Phe-induced tubulin tyrosinolation and phorbol 12-myristate 13-acetate-induced posttranslational incorporation of tyrosine into multiple proteins in activated neutrophils and HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 264, 848-855, 1989.

Nauseef, W.M.: Ontogeny of phagocytes. In: *Phagocytes and Disease*, M.S. Klempner, B. Styrut, J. Ho, eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1990, p. 1-23.

Nauseef, W.M., B.D. Volpp & R.A. Clark: Immunochemical and electrophoretic analyses of phosphorylated native and recombinant neutrophil oxidase component p47^{phox}. *Blood* 76, 2622-2629, 1990.

Nauseef, W.M., B.D. Volpp, S. McCormick, K.G. Leidal & R.A. Clark: Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.* 266, 5911-5917, 1991.

Nemenoff, R.A., S. Winitz, N.-X. Qian, V. van Putten, G.L. Johnson & L.E. Heasley: Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A₂ by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268, 1960-1964, 1993.

Niedel, J.E., I. Kahane, L. Lachman & P. Cuatrecasas: A subpopulation of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) displays the formyl peptide chemotactic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1000-1004, 1980.

Ninomiya, N., K. Hazeki, Y. Fukui, T. Seya, T. Okada, O. Hazeki & M. Ui: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fcγ receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 269, 22732-22737, 1994.

Nishibe, S., M.I. Wahl, S.M. Hernandez-Sotomayor, N.K. Tonks, S.G. Rhee & G. Carpenter: Increase of the catalytic activity of phospholipase C-γ 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* 250, 1253-1256, 1990.

Nishizuka, Y.: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665, 1988.

Nishizuka, Y.: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614, 1992.

Nothdurft, W.: Bone marrow. In: *Radiopathology of Organs and Tissues* (E. Scherer, C. Streffer & K.R. Trott, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1991, p. 113-169.

Novick, Jr., W.J., G. Sullivan & G. Mandell: New pharmacological studies with pentoxifylline. *Biorheology* 27, 449-454, 1990.

Nuzhat, A., J.F. Williams & M.J. Weidemann: The human promyelocytic HL60 cell line: A model of myeloid cell differentiation using dimethylsulfoxide, phorbol ester, and butyrate. *Biochemistry Intern.* 23, 591-602, 1991.

Ohtsuka, T., M. Hiura, K. Yoshida, N. Okamura & S. Ishibashi: A diacylglycerol kinase inhibitor, R59 022, potentiates superoxide anion production and 46-kDa protein phosphorylation in guinea pig polymorpho-nuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 265, 15418-15423, 1990.

Oismüller, C., N. Mayer, M. Micksche, H. Steltzer & A.F. Hammerle: In vivo modulation of human neutrophil function by pentoxifylline in patients with septic syndrome. *Shock* 4, 161-165, 1995.

Okada, T., L. Sakuma, Y. Fukui, O. Hazeki & M. Ui: Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 3563-3567, 1994.

Okuyama, M., J.-i. Kambayashi, M. Sakon, T. Kawasaki & M. Monden: PGI₂ analogue, sodium berapost, suppresses superoxide generation in human neutrophils by inhibiting p47^{phox} phosphorylation. *Life Sciences* 57, 1051-1059, 1995.

Ozaki, Y & S. Kume: Functional responses of aequorin-loaded human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 972, 113-119, 1988.

Packman, C.H. & M.A. Lichtman: Activation of neutrophils: measurement of actin conformational changes by flow cytometry. *Blood Cells* 16, 193-207, 1990.

Pai, J.-K., M.I. Siegel, R.W. Egan & M.M. Billah: Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 12472-12477, 1988.

Pai, J.-K., J.A. Pachter, I.B. Weinstein & W.R. Bishop: Overexpression of protein kinase C β 1 enhances phospholipase D activity and diacylglycerol formation in phorbol ester-stimulated rat fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 598-602, 1991.

Painter, R.B. & B.R. Young: Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7315-7317, 1980.

Pappu, A.S. & G. Hauser: Propranolol-induced inhibition of rat brain cytoplasmic phosphatidate phosphohydrolase. *Neurochem. Res.* 8, 1565-1575, 1983.

Park, D., D.-Y. Jhon, R. Kriz, J. Knopf & S.G. Rhee: Cloning, sequencing, expression, and G_q-independent activation of phospholipase C- β ₂. *J. Biol. Chem.* 267, 16048-16055, 1992.

Peppelenbosch, M.P., R.-G. Qiu, A.M.M. de Vries-Smits, L.G.J. Tertoolen, S.W. de Laat, F. McCormick, A. Hall, M.H. Symons & J.L. Bos: *Rac* mediates growth factor-induced arachidonic acid release. *Cell* 81, 849-856, 1995.

Perez, H.D., E. Kelly & R. Holmes: Regulation of formyl peptide receptor expression and its mRNA levels during differentiation of HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* 267, 358-363, 1992.

Perlmutter, R.M.: *Fgr* protein tyrosine kinase (vertebrates) (p59^{lck}). In: *The Protein Kinase FactsBook, Protein-Tyrosine Kinases* (G. Hardie & S. Hanks, eds.), Academic Press, London, 1995, p. 68-69.

Petroni, K.C., L. Shen & P.M. Guyre: Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN- γ and glucocorticoids. *J. Immunol.* 140, 3467-3472, 1988.

Pettitt, T.R., M. Zaqqa & M.J.O. Wakelam: Epidermal growth factor stimulates distinct diacylglycerol species generation in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for a potential phosphatidylcholine-specific phospholipase C-catalysed pathway. *Biochem. J.* 298, 655-660, 1994.

Philips, M.R., A. Feoktistov, M.H. Pillinger & S.B. Abramson: Translocation of p21^{rac2} from cytosol to plasma membrane is neither necessary nor sufficient for neutrophil NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 270, 11514-11521, 1995.

Piomelli, D.: Arachidonic acid in cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 274-280, 1993.

Poltoratsky, V.P., X. Shi, J.D. York, M.R. Lieber & T.H. Carter: Human DNA-activated protein kinase (DNA-PK) is homologous to phosphatidylinositol kinases. *J. Immunol.* 155, 4529-4533, 1995.

Posada, J. & J.A. Cooper: Molecular signal integration: interplay between serine, threonine and tyrosine phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* 3, 583-592, 1992.

Powis, G., R. Bonjouklian, M.M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W.F. Matter, J. Dodge, G. Grindey & C.J. Vlahos: Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* 54, 2419-2423, 1994.

Powis, G., S.R. Hill, T.J. Frew & K.W. Sherrill: Inhibitors of phospholipid intracellular signaling as antiproliferative agents. *Med. Res. Rev.* 15, 121-138, 1995.

Powis, G., M. Berggren, A. Gallegos, T. Frew, S. Hill, A. Kozikowski, R. Bonjouklian, L. Zalkow, R. Abraham, C. Ashendel, R. Schultz & R. Merriman: Advances with phospholipid signalling as a target for anticancer drug development. *Acta Biochim. Polonica*, 42, 395-403, 1995.

Prasad, A.V., N. Mohan, B. Chandrasekar & M.L. Meltz: Activation of nuclear factor κ B in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation. *Radiat. Res.* 138, 367-372, 1994.

Prasad, A.V., N. Mohan, B. Chandrasekar & M.L. Meltz: Induction of transcription of "immediate early genes" by low-dose ionizing radiation. *Radiat. Res.* 143, 263-272, 1995.

Price, B.D. & M.B. Youmell: The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res.* 56, 246-250, 1996.

Prossnitz, E.R., O. Quehenberger, C.G. Cochrane & R.D. Ye: Signal transducing properties of the N-formyl peptide expressed in undifferentiated HL60 cells. *J. Immunol.* 151, 5704-5715, 1993.

Qiu, Z.-H. & C.C. Leslie: Protein kinase C-dependent and -independent pathways of mitogen-activated protein kinase activation in macrophages by stimuli that activate phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 269, 19480-19487, 1994.

Quinn, M.T.: Low-molecular-weight GTP-binding proteins and leukocyte signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 58, 263-276, 1995.

Rameh, L.E., C.-S. Chen & L.C. Cantley: Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH₂ domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 83, 821-830, 1995.

Ramesha, C.S. & D.L. Ives: Detection of arachidonoyl-selective phospholipase A₂ in human neutrophil cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* 1168, 37-44, 1993.

Rana, R.S. & L.E. Hokin: Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 70, 115-164, 1990.

Rao, G.N., B. Lassegue, K.K. Griendling, R.W. Alexander & B.C. Berk: Hydrogen peroxide-induced *c-fos* expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C. *Nucleic Acids Res.* 21, 1259-1263, 1993.

Ravetch, J.V.: Fc receptors: rubor redux. *Cell* 78, 553-560, 1994.

Rehfeldt, W., K. Resch & M. Goppelt-Strube: Cytosolic phospholipase A₂ from human monocytic cells: characterization of substrate specificity and Ca²⁺-dependent membrane association. *Biochem. J.* 293, 255-261, 1993.

Rehring, T.F., E.C. Brew, R.S. Friese, A. Banerjee & A.H. Harken: Clinically accessible cell signaling: second messengers in sepsis and trauma. *J. Surg. Res.* 60, 270-277, 1996.

Reinhold, S.L., S.M. Prescott, G.A. Zimmerman & T.M. McIntyre: Activation of human neutrophil phospholipase D by three separable mechanisms. *FASEB J.* 4, 208-214, 1990.

Rhee, S.G. & K.D. Choi: Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isoenzymes. *J. Biol. Chem.* 267, 12393-12396, 1992.

Rhee, J.G., C.W. Song, T.H. Kim & S.H. Levitt: Effect of fractionation and rate of radiation dose on human leukemic cells, HL-60. *Radiat. Res.* 101, 519-527, 1985.

Ridley, A.J. & A. Hall: Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins *Rac* and *Rho*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 57, 661-671, 1992.

Riehemann, K. & C. Sorg: Eosinophilia: inhibition of apoptosis or differentiation? *Immunol. Today* 17, 98, 1996.

Robertson, A.K., A.R. Cross, O.T. Jones & P.W. Andrew: The use of diphenylene iodonium, an inhibitor of NADPH oxidase, to investigate the antimicrobial action of human monocyte derived macrophages. *J. Immunol. Methods* 133, 175-179, 1990.

Robinson, M., R. Burdine & T.R. Warne: Inhibition of phorbol ester-stimulated arachidonic acid release by alkylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta* 1254, 361-367, 1995.

Rodemann, H.P., H.-P. Peterson, K. Schwenke & K.-H. von Wangenheim: Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc.* 5, 1135-1142, 1991.

Rohr, E. L. & W. Kaffenberger: Fluorescence instability of propidium-iodide labelled microspheres in (para)formaldehyde. *Cytometry* 14, 584-586, 1993.

Roitt, I.M., J. Brostoff & D.K. Male: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1995, p. 1-399.

Rosen, G.M., S. Pou, C.L. Ramos, M.S. Cohen & B.E. Britigan: Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.* 9, 200-209, 1995.

Ross, D.W., K.B. Pryzwansky, M. Prenant & G. Dent: Leukemic cell maturation: variability of the myeloid leukemic cell phenotype. *Blood Cells* 12, 139-151, 1986.

Rossi, F.: The O_2^- -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 853, 65-89, 1986.

Rossi, P., L. Chini, A. Fattorossi, M. Gidlund, E. Galli, K. Laan, M. Jondal & H. Wigzell: 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 and phorbol esters (TPA) may induce select in vitro differentiation pathways in the HL60 promyelocytic cell line. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 44, 308-316, 1987.

Rossi, F., M. Grzeskowiak, V. Della Bianca, F. Calzetti & G. Gandini: Phosphatidic acid and not diacylglycerol generated by phospholipase D is functionally linked to the activation of the NADPH oxidase by FMLP in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 320-327, 1990.

Rothe, G., A. Oser & G. Valet: Dihydrorhodamine 123: a new cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75, 354-355, 1988.

Rothe, G., A. Emmendorffer, A. Oser, J. Roesler & G. Valet: Flow cytometric measurements of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Meth.* 138, 133-135, 1991.

Rovera, G., D. Santoli & C. Damsky: Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2779-2783, 1979.

Royall J.A. & H. Ischiropoulos: Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultures endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 302, 348-355, 1993.

Saleem, A., S. Kharbanda, Z.M. Yuan & D. Kufe: Monocyte colony-stimulating factor stimulates binding of phosphatidylinositol 3-kinase to Grb2.Sos complexes in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 10380-10383, 1995.

Samlaska, C.P. & E.A. Winfield: Pentoxifylline. *J. Am. Acad. Dermatol.* 30, 603-621, 1994.

Sands, W.A., J.S. Clark & F.Y.Liew: The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophages activated by IFN- γ and LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 461-466, 1994.

Sasaki, K., K. Ikeda, M. Nagai, H. Shima, M. Nagano, J. Takahara & S. Irino: Protein phosphatase 2A α involvement in granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Hematol. Oncol.* 11, 1-5, 1993.

Savill, J.S., A.H. Wyllie, J.E. Henson, M.J. Walport, P.M. Henson & C. Haslett: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* 83, 865-875, 1989.

Savitsky, K., A. Bar-Shira, S. Gilad, G. Rotman, Y. Ziv, L. Vanagaite, D.A. Tagle, S. Smith, T. Uziel, S. Sfez, M. Ashkenazi, I. Pecker, M. Frydman, R. Harnik, S.R. Patanjali, A. Simmons, G.A. Clines, A. Sartiel, R. Gatti, L. Chessa, O. Sanal, M.F. Lavin, N.G.J. Jaspers, A.M.R. Taylor, C.F. Arlett, T. Miki, S.M. Weissman, M. Lovett, F.S. Collins & Y. Shiloh: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-1753, 1995.

Sbarra, A.J. & M.L. Karnovsky: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234, 1355-1362, 1959.

Schiemann, W.P. & N.M. Nathanson: Involvement of protein kinase C during activation of the mitogen-activated protein kinase cascade by leukemia inhibitory factor. Evidence for participation of multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 269, 6376-6382, 1994.

Schiffmann, E., B.A. Corcoran & S.M. Wahl: N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1059-1062, 1975.

Schmitt, M. & B. Bültmann: Fluorescent chemotactic peptides as tools to identify the f-Met-Leu-Phe-receptor on human granulocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 219-222, 1990.

Schreck, R., P. Rieber & P.A. Bährle: Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10, 2247-2258, 1991.

Schütze, S., K. Potthoff, T. Machleidt, D. Berkovic, K. Wiegmann & M. Krönke: TNF activates NF kappa B by phosphatidylcholine specific phospholipase C induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 71, 765-776, 1992.

Schütze, S., T. Machleidt & M. Krönke: The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* 56, 533-541, 1994.

Schwenke, K., H.-P. Peterson, K.-H. von Wangenheim & L.E. Feinendegen: Induction of differentiation in erythroleukemia K562 cells by γ -irradiation. *Leukemia Res.* 19, 955-961, 1995.

Segal, A.W. & A. Abo: The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem. Sci.* 18, 43-47, 1993.

Segal, A.W., I. West, F. Wientjes, J.H. Nugent, A.J. Chavan, B. Haley, R.C. Garcia, H. Rosen & G. Scrace: Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* 284, 781-788, 1992.

Seibenhener, M.L. & M.W. Wooten: Heterogeneity of protein kinase C isoform expression in chemically induced HL-60 cells. *Exp. Cell Res.* 207, 183-188, 1993.

Sekiguchi, K., M. Tsukuda, K. Ogita, U. Kikkawa & Y. Nishizuka: Three distinct forms of rat brain protein kinase C: differential response to unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 797-802, 1987.

Selsted, M.E. & A.J. Ouellette: Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends Cell Biol.* 5, 114-119, 1995.

Sendler, A., W. Kaffenberger, I. Nuyken & D. van Beuningen: Proliferation kinetics and PCNA expression of HL-60 cells following ionizing irradiation and granulocytic differentiation. *Cell Prolif.* 26, 531-543, 1993.

Sha'afi, R.I. & T.F.P. Molski: Activation of the neutrophil. *Prog. Allergy* 42, 1-64, 1988.

Shafman, T.D., A. Saleem, J. Kyriakis, R.R. Weichselbaum & S. Kharbanda: Defective induction of stress-activated protein kinase activity in ataxia-telangiectasia cells exposed to ionizing radiation. *Cancer Res.* 55, 3242-3245, 1995.

Shearman, M.S., Z. Naor, K. Sekiguchi, A. Kishimoto & Y. Nishizuka: Selective activation of the gamma-subspecies of protein kinase C from bovine cerebellum by arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *FEBS Lett.* 243, 177-182, 1989.

Sherman, M.L., R. Datta, D.E. Hallahan, R.R. Weichselbaum & D.W. Kufe: Ionizing radiation regulates expression of the *c-jun* proto-oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 5663-5666, 1990.

Simms, H.H., M.M. Frank, T.C. Quinn, S. Holland & T.A. Gaither: Studies on phagocytosis in patients with acute bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 83, 252-260, 1989.

Sirak, A.A., J.D. Laskin, F.M. Robertson & D.L. Laskin: Failure of f-Met-Leu-Phe to induce chemotaxis in differentiated promyelocytic (HL-60) leukemia cells. *J. Leukoc. Biol.* 48, 333-342, 1990.

Smith, R.M. & J.T. Curnutte: Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 77, 673-686, 1991.

Smith, J.A. & M.J. Weidemann: Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 162, 261-268, 1993.

Smith, C.D., R.J. Uhing & R. Snyderman: Nucleotide regulatory protein-mediated activation of phospho-lipase C in human polymorphonuclear leukocytes is disrupted by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 262, 6121-6127, 1987.

Smith, R.J., L.M. Sam, J.M. Justen, G.L. Bundy, G.A. Bala & J.E. Bleasdale: Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 253, 688-697, 1990.

Sohn, U.D., B. Han, A.H. Tashjian, Jr., J. Behar & P. Biancani: Agonist-independent, muscle-type-specific signal transduction pathway in cat esophageal and lower esophageal sphincter circular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 273, 482-491, 1995.

Sozzani, S., D.E. Agwu, C.E. McCall, J.T. O'flaherty, J.D. Schmitt, J.D. Kent & L.C. McPhail: Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 267, 20481-20488, 1992.

Spence, M.W.: Sphingomyelinases. *Adv. Lipid Res.* 26, 3-23, 1993.

Stasi, M., P. Gresele, S. Porcellati, E. Quero, G.G. Nenci & G. Goracci: Activation of phospholipase A₂ and β -thromboglobuline release in human platelets: comparative effects of thrombin and fluoroaluminate stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1124, 279-287, 1992.

Stasia, M.J., B. Strulovici, S. Daniel-Issakani, J.M. Pelosin, A.C. Dianoux, E. Chambaz & P.V. Vignais: Immunocharacterization of beta- and zeta-subspecies of protein kinase C in bovine neutrophils. *FEBS Lett.* 274, 61-64, 1990.

Steinbeck, M.J., G.G. Hegg & M.J. Karnovsky: Arachidonate activation of the neutrophil NADPH-oxidase. Synergistic effects of protein phosphatase inhibitors compared with protein kinase activators. *J. Biol. Chem.* 266, 16336-16342, 1991.

Stephens, L.R., K.T. Hughes & R.F. Irvine: Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351, 33-39, 1991.

Stephens, L., A. Eguinoa, S. Corey, T. Jackson & P.T. Hawkins: Receptor stimulated accumulation of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate by G-protein mediated pathways in human myeloid derived cells. *EMBO J.* 12, 2265-2273, 1993.

Stephens, L., A. Smrcka, F.T. Cooke, T.R. Jackson, P.C. Sternweis & P.T. Hawkins: A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell* 77, 83-93, 1994.

Stephens, L., P.T. Hawkins, A. Equinoa & F. Cooke: A heterotrimeric GTPase-regulated isoform of PI3K and the regulation of its potential effectors. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 351, 211-215, 1996.

Stevenson, M.A., S.S. Pollock, C.N. Coleman & S.K. Calderwood: X-irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer Res.* 54, 12-15, 1994.

Stoyanov, B., S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nürnberg, P. Gierschik, K. Seedorf, J.J. Hsuan, M.D. Waterfield & R. Wetzker: Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 690-693, 1995.

Strieter, R.M., D.G. Remick, P.A. Ward, R.N. Spengler, J.P. Lynch, J. Larrick & S.L. Kunkel: Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 1230-1236, 1988.

Stuehr, D.J., O.A. Fasehun, N.S. Kwon, S.S. Gross, J.A. Gonzalez, R. Levi & C.F. Nathan: Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J.* 5, 98-103, 1991.

Styrt, B.: The role of phagocytes in non-infectious diseases. In: *Phagocytes and Disease* (M.S. Klempner, B. Styrt & J. Ho, eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1990, p. 145-169.

Sullivan, G.W., H.T. Carper, W.J. Novick, Jr. & G.L. Mandell: Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect. Immun.* 56, 1722-1729, 1988.

Suzuki, K., T. Yamaguchi, T. Oshizawa, Y. Yamamoto, T. Nishimaki-Mogami, T. Hayakawa & A. Takahashi: Okadaic acid induces both augmentation and inhibition of opsonized zymosan-stimulated super-oxide production by differentiated HL-60 cells. Possible involvement of dephosphorylation of a cytosolic 21K protein in respiratory burst. *Biochim. Biophys. Acta* 1266, 261-267, 1995.

Swarup, G., S. Cohen & D.L. Garbers: Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1104-1109, 1982.

Taetle, R., J. Oval, M. Smedsrud, C. Davis & B. Gänsbacher: Analysis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor action in differentiating myeloid leukemia cells: treatment with DMSO may reveal a common pathway for growth factor gene regulation. *Exp. Hematol.* 19, 213-220, 1991.

Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto & F. Tomita: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} -dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 397-402, 1986.

Tanaka, Y., K. Yoshihara, M. Tsuyuki, A. Itaya-Hironaka, Y. Inada. & T. Kamiya: Retinoid acid-specific induction of a protein kinase C isoform during differentiation of HL-60 cells. *J. Biochem. Tokyo* 111, 265-271, 1992.

Taniguchi, T.: Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255, 1995.

Tauber, A.I., N. Borregaard, E. Simons & J. Wright: Chronic granulomatous disease: A syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine* 62, 286-309, 1983.

Test, S.T. & S.J. Weiss: Quantitative and temporal characterization of the extracellular H_2O_2 pool generated by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 259, 399-405, 1984.

Thelen, M. & U. Wirthmueller: Phospholipases and protein kinases during phagocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 106-112, 1994.

Thelen, M., B. Dewald & M. Baggiolini: Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.* 73, 797-821, 1993.

Thelen, M., M.P. Wymann & H. Langen: Wortmannin binds specifically to 1-phosphatidylinositol 3-kinase while inhibiting guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor signaling in neutrophil leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4960-4964, 1994.

Toker, A., M. Meyer, K.K. Reddy, J.R. Falck, R. Aneja, S. Aneja, A. Parra, D.J. Burns, L.M. Ballas & L.C. Cantley: Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P_2 and PtdIns-3,4,5-P_3 . *J. Biol. Chem.* 269, 32358-32367, 1994.

Toksoz, D., C.M. Bunce, P.C.W. Stone, R.H. Michell & G. Brown: Variant cell lines from the human promyelocytic line HL-60. *Leukemia Res.* 6, 491-498, 1982.

Torres, M., F.L. Hall & K. O'Neill: Stimulation of human neutrophils with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces tyrosine phosphorylation and activation of two distinct mitogen-activated protein-kinases. *J. Immunol.* 150, 1573-1578, 1993.

Traynor-Kaplan, A.E., B.L. Thompson, A.L. Harris, P. Taylor, G.M. Omann & L.A. Sklar: Transient increases in phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264, 15668-15673, 1989.

Trudel, S., M.R. Pâquet & S. Grinstein: Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cells. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem. J.* 276, 611-619, 1991.

Tsunawaki, S. & C.F. Nathan: Release of arachidonate and reduction of oxygen. Independent metabolic bursts of the mouse peritoneal macrophage. *J. Biol. Chem.* 261, 11563-11570, 1986.

Tuominen, H., L. Leino & K.E.O. Åkerman: Does protein kinase C regulate receptor agonists-mediated elevation in the cytosolic Ca^{2+} in human neutrophils? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 998-1004, 1994.

Twomey, B., R.E. Muid, J.S. Nixon, A.D. Sedgwick, S.E. Wilkinson & M.M. Dale: The effect of new potent selective inhibitors of protein kinase C on the neutrophil respiratory burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 1087-1092, 1990.

Tyagi, S.R., M. Tamura, D.N. Burnham & J.D. Lambeth: Phorbol myristate acetate (PMA) augments chemoattractant-induced diglyceride generation in human neutrophils but inhibits phosphoinositide hydrolysis. Implications for the mechanism of PMA priming of the respiratory burst. *J. Biol. Chem.* 263, 13191-13198, 1988.

Tyagi, S.R., D.N. Burnham & J.D. Lambeth: On the biological occurrence and regulation of 1-acyl and 1-O-alkylididylglycerols in human neutrophils. Selective destruction of diacyl species using *Rhizopus* lipase. *J. Biol. Chem.* 264, 12977-12982, 1989.

Uckun, F.M., L.M. Tuel-Ahlgren, C.W. Song, K.G. Waddick, D.E. Myers, J. Kirihaara, J.A. Ledbetter & G.L. Schieven: Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinases in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9005-9009, 1992.

Uckun, F.M., G.L. Schieven, L.M. Tuel-Ahlgren, I. Dibirdik, D.E. Myers, J.A. Ledbetter & C.W. Song: Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signaling pathway in human B-lymphocyte precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 252-256, 1993.

Uckun, F.M., W.E. Evans, C.J. Forsyth, K.G. Waddick, L.M. Tuel-Ahlgren, L.M. Chelstrom, A. Burkhardt, J. Bolen & D.E. Myers: Biotherapy of B-cell precursor leukemia by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kinases. *Science* 267, 886-891, 1995.

Uehara, Y. & H. Fukazawa: Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein-tyrosine kinases. *Methods Enzymol.* 201, 370-379, 1991.

- Ueta, E. & T. Osaki: Suppression by anticancer agents of reactive oxygen generation from polymorpho-nuclear leukocytes. *Free Rad. Res.* 24, 39-53, 1996.
- Uings, I.J., N.T. Thompson, R.W. Randall, G.D. Spacey, R.W. Bonser, A.T. Hudson & L.G. Garland: Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil. *Biochem J.* 281, 597-600, 1992.
- van Epps, D.E., J.G. Bender, S.J. Simpson & D.E. Chenoweth: Relationship of chemotactic receptors for formyl peptide and C_{5a}, CR₃, and Fc receptors on human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 47, 519-527, 1990.
- van Kuijk, F.J., G.J. Handelsmann & E.A. Dratz: A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem. Sci.* 12, 31-34, 1987.
- Varani, J. & P.A. Ward: Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock* 2, 311-319, 1994.
- Varki, A.: Selectin ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7390-7397, 1994.
- Vlahos, C.J., W.F. Matter, K.Y. Hui & R.F. Brown: A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241-5248, 1994.
- Vlahos, C.J., W.F. Matter, R.F. Brown, A.E. Traynor-Kaplan, P.G. Heyworth, E.R. Prossnitz, R.D. Ye, P. Marder, J.A. Schelm, K.J. Rothfuss, B.S. Serlin & P.J. Simpson: Investigation of neutrophil signal transduction using a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* 154, 2413-2422, 1995.
- von Wangenheim, K.-H., H.-P. Peterson & K. Schwenke: A major component of radiation action: interference with intracellular control of differentiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 68, 369-388, 1995.
- Vovells, S.J., S. Sekhsaria, H.L. Malech, M. Shalit & T.A. Fleisher: Flow cytometric analysis of the granulo-cyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods* 178, 89-97, 1995.
- Wang, S.Y., L.Y. Chen, S.J. Wang, C.K. Lin & C.K. Ho: Growth inhibition and differentiation in HL-60 leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and tumor necrosis factor. *Exp. Hematol.* 19, 1025-1030, 1991.
- Wang, J.-F., P. Komarov, H. Sies & H. de Groot: Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester-activated Kupffer cells. *Biochem. J.* 279, 311-314, 1991a.
- Wang, J.-F., P. Komarov & H. de Groot: Luminol chemiluminescence in rat macrophages and granulocytes: the roles of NO, O₂⁻/H₂O₂, and HOCl. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 189-196, 1993.

Ward, P.A. & M.S. Mulligan: Leukocyte oxygen products and tissue damage. In: *Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*, (A.J. Jesaitis & E.A. Dratz, eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1992, p. 139-147.

Watson, F., J. Robinson & S.W. Edwards: Protein kinase C-dependent and -independent activation of the NADPH oxidase of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266, 7432-7439, 1991.

Weichselbaum, R.R., Greenberger, J.S., A. Schmidt, A. Karpas, W.C. Moloney, & J.B. Little: In vitro radio-sensitivity of human leukemia cell lines. *Radiology* 139, 485-487, 1981.

Weichselbaum, R.R., M.A. Beckett, J.L. Schwartz & A. Dritschilo: Resistant tumor cells are present in head and neck carcinomas that recur after radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 15, 575-579, 1988.

Weichselbaum, R.R., D.E. Hallahan, V. Sukhatme, A. Dritschilo, M.L. Sherman & D.W. Kufe: Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 480-484, 1991.

Weichselbaum, R.R., D.E. Hallahan & G.T.Y. Chen: Biological and physical basis to radiation oncology. In: *Cancer Medicine*, 3rd ed. (J. Holland, E. Frei, R.C. Bast, D.W. Kufe, D.L. Morton & R.R. Weichselbaum, eds.), Lea & Febiger, Malvern, PA, USA, 1993, p. 539-565.

Weichselbaum, R.R., D.E. Hallahan, Z. Fuks & D.W. Kufe: Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30, 229-234, 1994.

Weil, S.C., G.L. Rosner, M.S. Reid, R.L. Chisholm, N.M. Farber, J.K. Spitznagel & M.S. Swanson: cDNA cloning of human myeloperoxidase: Decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2057-2061, 1987.

Weiss, S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320, 365-375, 1989.

Wiegmann, K., S. Schütze, T. Machleidt, D. Witte & M. Krönke: Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78, 1005-1015, 1994.

Wientjes, F.B. & A.W. Segal: NADPH oxidase and the respiratory burst. *Sem. Cell Biol.* 6, 357-365, 1995.

Wientjes, F.B., J.J. Hsuan, N.F. Totty & A.W. Segal: p40^{phox}, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain *src* homology 3 domains. *Biochem. J.* 296, 557-561, 1993.

Wiles, M.E., J.A. Dykens & C.D. Wright: Regulation of polymorphonuclear leukocyte membrane fluidity: effect of cytoskeletal modification. *J. Leukoc. Biol.* 56, 192-199, 1994.

Wiles, M.E., J.A. Dykens & C.D. Wright: Human neutrophil (PMN) oxygen radical production and the cytoskeleton. *Life Sciences* 57, 1533-1546, 1995.

- Wolf, M. & M. Baggiolini: The protein kinase inhibitor staurosporine, like phorbol esters, induces the association of protein kinase C with membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154, 1273-1279, 1988.
- Woloschak, G.E. & C.-M. Chang-Liu: Differential modulation of specific gene expression following high- and low-LET radiations. *Radiat. Res.* 124, 183-187, 1990.
- Woloschak, G.E. & C.-M. Chang-Liu: Expression of cytoskeletal elements in proliferating cells following radiation exposure. *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 1173-1183, 1991.
- Woloschak, G.E., C.-M. Chang-Liu & P. Shearin-Jones: Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res.* 50, 3963-3967, 1990.
- Wong, K., X.-B. Li & N. Hunchuk: N-Acetylsphingosine (C₂-ceramide) inhibited neutrophil superoxide formation and calcium influx. *J. Biol. Chem.* 270, 3056-3062, 1995.
- Woodman, R.C., J.M. Ruedi, A.J. Jesaitis, N. Okamura, M.T. Quinn, R.M. Smith, J.T. Curnutte & B.M. Babior: Respiratory burst oxidase and three of four oxidase-related polypeptides are associated with the cytoskeleton of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 87, 1345-1351, 1991.
- Worthen, G.S., N. Avdi, A.M. Buhl, N. Suzuki & G.L. Johnson: FMLP activates *Ras* and *Raf* in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 94, 815-823, 1994.
- Wymann, M.P., V. von Tscharner, D.A. Deranleau & M. Baggiolini: The onset of the respiratory burst in human neutrophils. Real-time studies of H₂O₂ formation reveal a rapid agonist-induced transduction process. *J. Biol. Chem.* 262, 12048-12053, 1987.
- Wymann, M.P., V. von Tscharner, D.A. Deranleau & M. Baggiolini: Chemiluminescence detection of H₂O₂ produced by human neutrophils during the respiratory burst. *Anal. Biochem.* 165, 371-378, 1987a.
- Yamaguchi, M., J. Sasaki, M. Kuwana, M. Sakai, N. Okamura & S. Ishibashi: Cytosolic protein phosphatase may turn off activated NADPH oxidase in guinea pig neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 209-214, 1993.
- Yamaguchi, M., H. Oishi, S. Araki, S. Saeki, H. Yamane, N. Okamura & S. Ishibashi: Respiratory burst and tyrosine phosphorylation by vanadate. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 382-386, 1995.
- Yang, K.D. & H.R. Hill: Neutrophil function disorders: Pathophysiology, prevention, and therapy. *J. Pediatr.* 119, 343-354, 1991.
- Yano, H., S. Nakanishi, K. Kimura, N. Hanai, Y. Saitoh, Y. Fukui, Y. Nonomura & Y. Matsuda: Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockage of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 25846-25856, 1993.
- Younes, A., D.W. Kahn, J.M. Besterman, R. Bittman, H.-S. Byun & R.N. Kolesnick: Ceramide is a competitive inhibitor of diacylglycerol kinase in vitro and in intact human leukemia (HL-60) cells. *J. Biol. Chem.* 267, 842-847, 1992.

Yu, H., S.J. Suchard, R. Nairn & R. Jove: Dissociation of mitogen-activated protein kinase activation from the oxidative burst in differentiated HL-60 cells and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 270, 15719-15724, 1995.

Yule, D.I. & J.A. Williams: U73122 inhibits Ca^{2+} oscillations in response to cholecystikinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 267, 13830-13835, 1992.

Ziegler-Heitbrock, H.W.L. & R.J. Ulevitch: CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today* 14, 121-125, 1993.

Zvelebil, M.J., L. MacDougall, S. Leervers, S. Volinia, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, G. Panayotou, J. Domin, R. Stein, F. Pages, H. Koga, K. Salim, J. Linacre, P. Das, C. Panaretou, R. Wetzker & M. Waterfield: Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351, 217-223, 1996.