

Isolierung und Charakterisierung pathogenmusterassoziierter Moleküle aus Hefen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Robert Häsler

Kiel
2001

Referent/in:	Prof. Dr. Thomas Bosch
Korreferent/in:	Prof. Dr. Dr. Enno Christophers
Tag der mündlichen Prüfung:	17. Juli 2001
Zum Druck genehmigt: Kiel, den	17. Juli 2001

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen.....	6
1	Einleitung.....	8
1.1	Dermatomykosen.....	8
1.2	Die menschliche Haut und ihre Abwehrmechanismen gegen Pilze.....	9
1.2.1	Barrierefunktion der Haut.....	9
1.2.2	Erkennung von pathogenen Strukturen.....	10
1.2.3	Abwehrzellen der Haut.....	10
1.3	Funktionen von Entzündungsmediatoren in der menschlichen Haut.....	12
1.4	Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Verwendete Chemikalien.....	15
2.2	Verwendete Puffer und Medien.....	16
2.3	Verwendete Geräte.....	16
2.4	Verwendete Software.....	17
2.5	Präparation von Lipidextrakten aus Hefen.....	17
2.6	Chromatographische Reinigung der Lipidextrakte.....	18
2.7	Präparation von Lipidextrakten aus anderen Organismen.....	19
2.8	Methoden zur Überprüfung der biologischen Aktivität.....	19
2.8.1	Isolierung von Leukozyten aus venösem Blut.....	20
2.8.2	Untersuchung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten.....	20
2.8.3	Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten.....	21
2.8.4	Messung des Kalziumeinstromes in neutrophilen Granulozyten.....	22
2.8.5	Untersuchung der Signaltransduktion in neutrophilen Granulozyten.....	23
2.9	Abbau von Phosphocholinen durch Phospholipase C und D.....	23
2.10	Massenspektrometrische Untersuchungen.....	24
2.10.1	Massenspektrometrische Analysen mittels Fast Atom Bombardment-Ionisation (FAB).....	24
2.10.2	Massenspektrometrische Analysen mittels Electron Impact-Ionisation (EI).....	24
2.10.3	Massenspektrometrische Analysen mittels Electrospray Ionisation (ESI).....	24
2.10.4	Analysemethoden mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit anschliessender Massenspektrometrie (HPLC-MS).....	25
2.10.5	Bestimmung der exakten Masse.....	25
2.11	Kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen.....	25
2.12	Herstellung von Bis-acyl-harnstoffderivaten.....	25
2.13	Synthese von Mono-acyl-harnstoffen.....	25
2.14	Erstellen einer Eichkurve zur Mengenbestimmung über HPLC.....	26
2.15	Zellkultursysteme.....	26
2.15.1	Keratinozytenzelllinien.....	26
2.15.2	Primäre humane Keratinozytenzellkulturen.....	26
2.15.3	Stimulation von Zellkulturen mit Lipiden.....	27

2.16	Messung der mRNA-Expression.....	27
2.16.1	Isolierung der mRNA.....	27
2.16.2	Reverse Transkription.....	27
2.16.3	Duplex-PCR.....	27
2.16.4	Agarosegelelektrophorese.....	28
2.16.5	Primer und Sequenzen.....	28
3	Ergebnisse.....	29
3.1	Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> enthält verschiedene LILAs.....	29
3.2	LILA-1 und LILA-2: zwei exogene Chemotaxine mit struktureller Ähnlichkeit.....	31
3.2.1	LILA ist weder ein Lysophosphatidylcholin noch ein Phospholipid.....	31
3.2.2	LILA-1 enthält Palmitoleinsäure in gebundener Form.....	35
3.2.3	LILA-2 enthält Linolsäure in gebundener Form.....	37
3.2.4	LILA-1 und LILA-2 besitzen ein gemeinsames strukturelles Motiv.....	40
3.3	Die Inkubation von Harnstoff mit Säurechloriden liefert Substanzen, die LILA-1 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> gleichen.	42
3.3.1	Eichkurve zur Mengenbestimmung von Bis-acyl-harnstoffen.....	45
3.3.2	Elektrospray-Ionisations-massenspektrometrische Analysen natürlicher und synthetischer LILAs.....	47
3.3.3	Natürliche LILAs und synthetische Bis-acyl-harnstoffe bilden die selben Abbauprodukte.....	49
3.3.4	Die Beilsteindatenbank enthält keine LILA-ähnlichen Substanzen.....	54
3.3.5	Synthetische Bis-acyl-harnstoffe sind nicht zytotoxisch.....	54
3.3.6	Neutrophile Granulozyten reagieren auf synthetische Bis-acyl-harnstoffe dosisabhängig.	55
3.3.7	Bis-palmitoleoyl-harnstoff und natürliches LILA-1 zeigen ähnliche Dosis-Wirkungskurven.....	56
3.3.8	Mono-acyl-harnstoff ist biologisch inaktiv.....	57
3.3.9	Monoacylharnstoff inhibiert nicht die durch Bis-acyl-harnstoff induzierten Freisetzung der Myeloperoxidase.....	57
3.4	Keratinocyten exprimieren IL-8 mRNA nach Stimulation mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff.....	59
3.4.1	Untersuchungen zur Signaltransduktion von LILA-1 in neutrophilen Granulozyten.....	60
3.4.2	Verschiedene Bis-acyl-harnstoffe zeigen unterschiedliche Signalcharakteristika.....	67
3.4.3	Natürliche LILAs verhalten sich wie ihre synthetischen Äquivalente.....	68
3.5	Isolierung und Charakterisierung weiterer LILAs.....	69
3.6	Versuche zur Isolierung von LILAs aus anderen biologischen Quellen....	72
3.6.1	Menschliches Blut enthält kein LILA.....	72
3.6.2	Sojabohnen-Lipidextrakte enthalten kein LILAs.....	73
3.6.3	Die Hefe <i>Pichia pastoris</i> enthält LILA.....	74
3.7	LILA-Präparationen enthalten eine Antioxidans als Leukozytenaktivator.	75
3.7.1	Massenspektrometrische Identifizierung von TBBC.....	75
3.7.2	Eigenschaften des in LILA-Präparationen identifizierten TBBC.....	76
4	Diskussion.....	79

4.1	Isolierung und Charakterisierung von pathogenassoziierten Molekülen aus Hefen.....	79
4.1.1	Menschliche Granulozyten erkennen verschiedene LILAs	80
4.1.2	LILA gehört zu einer bisher unbekannt Substanzklasse.....	81
4.1.3	LILA als mögliches Produkt der Lipidumwandlung in Pilzen.....	85
4.2	Neutrophile Granulozyten reagieren dosisabhängig auf LILA-Stimulation	85
4.3	Der Signaltransduktionsweg von LILA in neutrophilen Granulozyten.....	86
4.4	Die evolutorische Stellung des LILA-Erkennungsmechanismus	90
4.5	Die Bedeutung des LILA-Systems für die menschliche Immunabwehr....	91
4.6	Das Synthetische Antioxidans TBBC als neuer Leukozytenaktivator.....	94
4.7	Ausblick	95
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literaturverzeichnis	98
7	Lebenslauf.....	110
8	Erklärung.....	111

Abkürzungen

°C	Grad Celsius	Hz	Hertz
μ	mikro-	IL-1b	Interleukin 1β
A	Ampère	kb	Kilobasen (1000 Nukleinsäuren)
AGGC	Acetyl-Geranyl-Geranyl-Cystein	l	Liter
AU	Absorptionseinheiten (absorption units)	LB	Luria-Bertani (-Medium)
bp	Basenpaare	LDMS	Laser Desorption Massenspektrometrie
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)	LILA	Lipidartiger Leukozytenaktivator
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure	LPC	Lysophosphatidylcholin
CSPD	3-(4-methoxyspiro{1,2-diox-ethane-3,2-(5-chloro)tricyclo[3.3.1.3.7]decan}-4-yl) phenylphosphat	m	Meter
D	Dalton	m	milli-
d	Tag (day)	M	molar
DEPC	Diethylpyrocarbonat	MALDI	Matrix assisted laser desorption
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MEM	Minimalmedium (minimum essential medium)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat	MH⁺	Protoniertes Molekölion
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)	MHC	Myosin Heavy Chain, schwere Myosinkette
EGTA	Bis-aminoethyl-glykoethertetraessigsäure	min	Minute
EI	Electron Impact (2.10.2, Seite 24)	MOPS	(N-Morpholino)propansulfonsäure
ELISA	Enzymgebundener Immunoassay (enzyme-linked immunosorbent assay)	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
ESI	Electrospray Ionisation	n	Anzahl der Experimente
EtOH	Ethanol	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
FAB	Fast Atom Bombardment (2.10.1, Seite 24)	NIST	National Institute of Standards and Technology
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)	NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
FMLP	N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin	NMT	N-Myristoyltransferase zur Analyse
g	Erdbeschleunigung	p.A.	Polyacrylamid
g	Gramm	PAA	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
h	Stunde (hour)	PBS	Polymerase-Kettenreaktion
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure	PCR	Phorbol Myristat Acetat
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)	PMA	Ribonukleinsäure
		RNA	Ribonuklease
		RNase	Umkehrphase (reversed phase)
		RP	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
		rpm	Raumtemperatur (18-22°C)
		RT	

RT-PCR	reverse Transkriptase gekoppelt mit einer Polymerase-Kettenreaktion	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
s	Standardabweichung	Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)	UTP	Uraciltriphosphat
sec	Sekunde	UV	Ultraviolett
SEM	Standardabweichung, ausgehend von der Grundgesamtheit (standard error of the mean)	V	Volt
TBBC	4,4'-Thiobis(6-tert-Butyl-m-Cresol)	v/v	Volumen/Volumen
TBE	Tris-Borat-Ethyldiamintetra-azetat	w/v	Gewicht/Volumen (weight/volume)
		X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-beta-D-galactopyranoside

1 Einleitung

Die Fähigkeit des Menschen, sich gegen die Vielzahl an Keimen zu schützen, die ihn ständig bedrohen, beruht auf einem komplexen System aus Verteidigungsmechanismen. Den wichtigsten Teil dieses Systems stellt das Immunsystem dar. Daneben spielt auch die menschliche Haut als schützendes Organ eine wichtige Rolle: sie ist eine dünne, aber sehr widerstandsfähige Barriere. Die äußerste Schicht der menschlichen Haut, das *Stratum corneum*, verhindert, dass größere Moleküle, einschließlich Mikroorganismen, in lebendes Gewebe eindringen können. Wenn ein Erreger diese Barriere überwindet und in lebendes Gewebe gelangt, wird er durch eine Reihe von Abwehrmechanismen unschädlich gemacht. Hierzu gehören Serumproteine (Antikörper), die an den eindringenden Mikroorganismus binden und auf diese Weise das Komplementsystem aktivieren. Ebenso werden Granulozyten und Makrophagen aktiviert, die diese Mikroorganismen phagozytieren können. Ein besonderer Fall einer Infektion liegt vor, wenn der Erreger ausschließlich im *Stratum corneum* verbleibt, und sich somit dem Einfluss der Abwehrzellen weitestgehend entzieht. Zu diesen Erregern gehören Dermatophyten – diese Pilze können eine sogenannte Dermatomykose auslösen.

1.1 Dermatomykosen

Dermatophyten infizieren ausschließlich tote, keratinisierte Strukturen des Körpers. Die menschliche Haut besitzt, im Gegensatz zu der vieler anderer Säuger, ein relativ dickes *Stratum corneum*, welches es dem Pilz ermöglicht, lange in dieser Schicht zu wachsen, ohne durch die Abgabe von erregerspezifischen Substanzen in tiefere Hautschichten eine Immunantwort des Wirtsorganismus auszulösen.

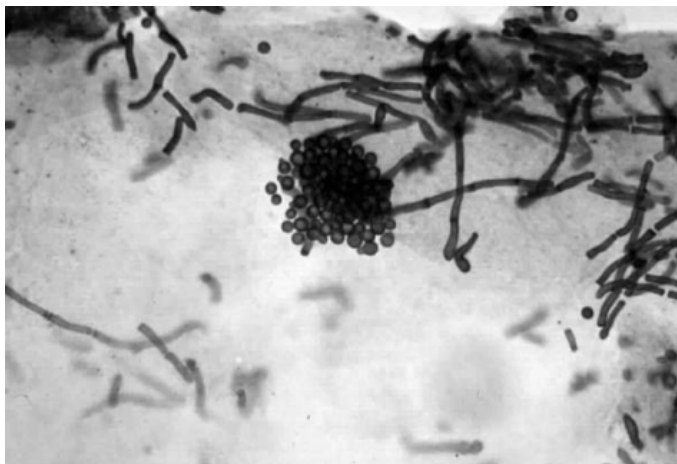


Abbildung 1-1: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit *Malassezia furfur* auf menschlicher Haut; Quelle: Dermatology Online-Database, Medical Mycology Research Center, Dept. of Pathology, University of Texas, Medical Branch (MMRC-UTMB).

Übertragen werden Dermatomykosen (Infektionen der Haut mit Dermatophyten) durch Kontakt mit infizierten Tieren oder Menschen, sowie durch Kontakt mit erregertragendem Material wie Hautschuppen oder Nagelpartikel infizierter Personen (Weitzman und Summerbell, 1995). Ein entscheidender Faktor für die Pathogenität der Dermatophyten ist ihre Fähigkeit, auf der Hautoberfläche zu adhären (Calderone, 1993). Nachdem sich der Pilz auf dem *Stratum cor-*

neum festgesetzt hat, beginnt innerhalb weniger Stunden die Auskeimung der Pilzelemente (Zurita und Hay, 1987). Anschließend wird die Hornschicht von auswachsenden Hyphen des Dermatophyten penetriert. Dermatophyten nutzen Keratin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, sie sind hierzu mit einer Reihe lytischer Enzyme ausgestattet: Elastase, Lipase, Protease, Sulfatase, Peptidase, Urease und Keratinase (Rippon und Garber, 1969).

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Pilze als Erreger für Erkrankungen des Menschen, wie Tinea Favosum (eine Pilzkrankung der Haare, der Epidermis der Kopfhaut sowie der Nägel), identifiziert (Ajello, 1974). Heute stellen Dermatomykosen vor allem eine Bedrohung für immunsupprimierte Patienten, wie HIV-infizierte, Tumorpatienten oder Organempfänger, dar (Braun-Falco *et al.*, 1984; Brandis und Pulverer, 1988). Chronische Pilzinfektionen können zu schwerwiegenden Störungen des Wirtsorganismus führen: Eine chronische oberflächliche Candidiasis kann eine sogenannte Candida Endokrinopathie verursachen. Dies bezeichnet endokrine Hypofunktionen wie Hypoadrenalismus, Hypothyroidie, Eierstockinsuffizienz und Diabetes mellitus (Filler und Edwards, 1993). In der überwiegenden Zahl der Fälle sind Dermatomykosen jedoch nicht lebensbedrohlich und meist selbstlimitierend (Braun-Falco *et al.*, 1984).

1.2 Die menschliche Haut und ihre Abwehrmechanismen gegen Pilze

Alle Epithelien, die regelmäßig in Kontakt mit pathogenen Keimen treten, sind mit entsprechenden Abwehrmechanismen ausgestattet. Im Fall der Haut stellen Dermatophyten einen Teil dieser Keime dar, demzufolge findet man in der Haut eine Reihe von Verteidigungsebenen gegen Dermatophyten. Die menschliche Haut ist nicht nur ein passives Barriereorgan, sondern kann durch aktive Prozesse (1.2.1 bis 1.2.3) die Funktion eines immunologischen Organs übernehmen.

1.2.1 Barrierefunktion der Haut

Die Oberfläche der menschlichen Haut ist für Pilzwachstum relativ ungeeignet: Einstrahlung von UV-Licht, überwiegend geringe Feuchtigkeit und die Konkurrenz mit Bakterien der normalen Hautflora erschweren den Dermatophyten die Ansiedelung. Beispielsweise enthalten Lipide aus dem Haar von Erwachsenen gesättigte Fettsäuren, die fungistatisch gegen *Microsporum audouini* wirken. Dieser Pilz kann Kopfhautinfektionen und Haarinfektionen auslösen (Rothman *et al.*, 1947). Neuere Untersuchungen zeigten, dass vor allem Sphingosine aus den oberen Hautschichten gegen *Candida albicans* und verschiedene andere Dermatophyten aktiv sind (Bibel *et al.*, 1993). Das Vordringen der Pilze in tiefere Schichten wird möglicherweise auch durch Transferrin verhindert, welches mit den Pilzen um Eisenionen konkurriert (King *et al.*, 1975).

Einen wichtigen Teil der unspezifischen, angeborenen Abwehr gegen Pilze bilden spezielle antimikrobielle Peptide: Ein Beispiel hierfür ist das in entzündeter Haut exprimierte antimikrobielle Peptid hBD-2. Es ist gegen *Candida albicans* aktiv, und wird in seiner Expression durch den Befall mit diesem Erreger reguliert (Harder *et al.*, 1997). Untersuchungen zur unspezifischen Abwehr gegen Pilze führten zur Isolierung des antifungalen Peptides Drosomycin aus der Fruchtfliege *Drosophila*. Ein humanes Analogon zum antifungalen Peptid Drosomycin aus Insekten (Landon *et al.*, 1997), welches in der Haut eine Abwehrfunktion übernehmen könnte, ist derzeit noch nicht bekannt. Hinweise auf die Existenz von wirksamen unspezifischen Abwehrmechanismen gegen Pilze in der menschlichen Haut gibt die Beobachtung, dass immunsupprimierte Patienten, die an Derma-

tomykosen leiden, keine massiven systemischen oder tiefen Infektionen zeigen (Kauffman *et al.*, 1981).

Die meisten Mikroorganismen sind nicht in der Lage, Keratine zu verdauen und können sich somit nicht im *Stratum corneum* ansiedeln, welches einen hohen Keratingehalt aufweist. Eine Ausnahme bilden die Dermatophyten, die mit Keratinasen dieses Protein abzubauen vermögen (Negi *et al.*, 1984). Demgegenüber steht der Vorgang, durch den sich das *Stratum corneum* ständig erneuert. Dies ermöglicht es der Haut, durch Abschuppung (Desquamation) Pilze zu entfernen. Bei einer Dermatomykose teilen sich die Keratinozyten verstärkt, um diesen Prozess zu beschleunigen (Berk *et al.*, 1976).

1.2.2 Erkennung von pathogenen Strukturen

Bevor es zu einer zielgerichteten Abwehr gegen Eindringlinge kommen kann, müssen diese vom Wirtsorganismus erkannt werden. Vertebraten verfügen hierzu über ein komplexes System von Erkennungsmechanismen, die in der Lage sind, körperfremde Strukturen von körpereigenen zu unterscheiden: Antikörper binden an eingedrungene Mikroorganismen und aktivieren auf diese Weise das Komplementsystem („klassischer Weg der Komplementaktivierung“). Der alternative Weg der Komplementaktivierung erfolgt zum Beispiel durch Immunglobulin A, Immunglobulin G sowie Lipopolysaccharide oder FMLP aus Bakterien. Die anschließende Rekrutierung der Effektorzellen läuft über eine mehrstufige Informationsweiterleitung unter der Beteiligung verschiedener Funktionseinheiten: Glykoproteine des Komplementsystems führen zur Bildung und Freisetzung von Chemotaxinen sowie zur Opsonisierung der Mikroorganismen um die Phagozytose zu ermöglichen. Darüber hinaus können die Glykoproteine des Komplementsystems C5b, C6, C7, C8 und C9 einen Komplex bilden, der Bakterien lysiert (Fukazawa *et al.*, 1994; Levy, 1996).

Neben dieser komplementvermittelten Immunantwort hat der Körper noch die Möglichkeit, auf einige Fremdelemente direkt mit den Effektorzellen zu reagieren. Besonders wichtig ist eine solche direkte Aktivierung bei Erregern wie Dermatophyten, die nicht mit den Gewebsflüssigkeiten des Wirtes und somit auch nicht mit dem Komplementsystem in Kontakt treten. Neutrophile Granulozyten (siehe 1.2.3) können auf solche direkten Stimuli innerhalb von Sekunden reagieren (Walker und Ward, 1992). Formylierte Methionylpeptide (FMLP) aus Bakterien (Schiffmann *et al.*, 1975) sowie Peptide aus verschiedenen Streptococcenspecies (Miyake *et al.*, 1983; Rot *et al.*, 1987) können durch Bindung an sogenannte FP-Rezeptoren von Abwehrzellen erkannt werden. Pilzhyphen aktivieren Neutrophile Granulozyten innerhalb kürzester Zeit (30 sec bis 5 min). Dies gilt für opsonisierte und unopsonierte Hyphen (Meshulam *et al.*, 1995). Die Aktivierung durch unopsonierte Hyphen spricht für die Fähigkeit der Zellen, ohne das Komplementsystem auf Dermatophyten zu reagieren.

1.2.3 Abwehrzellen der Haut

Die menschliche Haut verfügt über ein breites Arsenal an Abwehrzellen um sich vor Mikroorganismen zu schützen. Hierzu gehören Keratinozyten, epidermale Langerhans Zellen, dermale dendritische Zellen und epidermale T-Lymphozyten. Granulozyten, die in gesunder Haut nicht vorkommen, wandern im Fall einer Infektion in die betroffenen Gewebe ein und phagozytieren eingedrungene Erreger – sie stellen somit ebenfalls eine für die Haut wichtige Zellpopulation dar.

Epidermale Langerhans-Zellen sind antigenpräsentierende Zellen, die Antigene phagozytieren, prozessieren und für die T-Zell-Aktivierung präsentieren (Sousa *et al.*, 1993). Als Vorläufer dieser Zellen werden dermale dendritische Zellen diskutiert (Nestle *et al.*, 1993), welche möglicherweise ebenfalls Antigene präsentieren (Kurimoto *et al.*, 1994). Zudem findet man in der Haut sowohl ruhende als auch bereits sensitivierte T-Lymphozyten (Wagner und Sohnle, 1995). Keratinozyten spielen nicht nur eine strukturelle Rolle beim Aufbau der physikalischen Barriere, sie sezernieren auch eine Reihe von Faktoren, die eine Immunantwort verstärken oder vermindern. Hierzu gehören Oberflächenmarker, Adhäsionsmoleküle (Garrod, 1986) und Zytokine (Schröder, 1995a). Die meisten dieser Faktoren werden nicht konstitutiv produziert, sondern deren Genexpression wird im Fall einer Entzündung hochreguliert (Stingl, 1993). Mikrovaskuläre Endothelzellen sind an der Wundheilung durch Prozesse der Angiogenese beteiligt und sezernieren, wie Keratinozyten, eine Reihe löslicher Entzündungsmediatoren (Wagner und Sohnle, 1995).

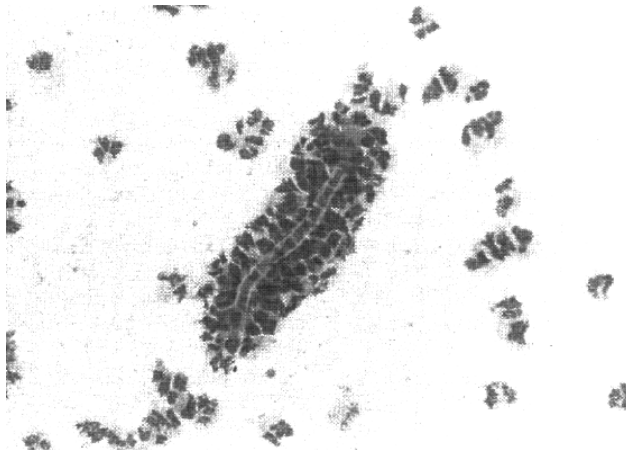


Abbildung 1-2:

Lichtmikroskopische Aufnahme eines in vitro-Ansatzes zur Demonstration des Adhärenzverhaltens neutrophiler Granulozyten an Pilzhypfen (Dahl, 1994). Die Pilzhyphe ist vollständig von neutrophilen Granulozyten bedeckt.

Granulozyten gehören nicht zu den Zellen der Haut, spielen jedoch eine sehr wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen der Haut: Eosinophile Granulozyten stellen die Hauptverteidigung gegen in die Haut eingedrungene Fremdkörper und multi-zelluläre Parasiten dar (Kay, 1976). Im Fall einer Dermatomykose stehen neutrophile Granulozyten aufgrund ihrer Eigenschaften als Abwehrzellen im Vordergrund (Rogers und Balish, 1980). Sie sind Teil des antigenunspezifischen Verteidigungssystems. Dieser Zelltyp ist in der Lage, charakteristische Substanzen aus Dermatophyten zu erkennen (Tagami *et al.*, 1982), in das infizierte Gewebe einzuwandern (Sohnle und Hahn, 1989; Cronstein und Weissmann, 1993) und den eingedrungenen Mikroorganismus zu phagozytieren (Odds, 1988). Dadurch wird auch das mikrobielle Wachstum limitiert und somit Zeit für die folgende Immunantwort gewonnen (Mannion *et al.*, 1990). Die Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten verdeutlichen ihre Rolle in der Pilzabwehr: Neutrophile Granulozyten phagozytieren den Erreger und bilden neben reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen (O_2^-) (Babior, 1992), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorsäure (HOCl) (Weiss, 1989) auch reaktive Stickstoffspezies, kurzlebige Stickstoffoxidradikale ($NO\cdot$) (Kwon *et al.*, 1990) und Peroxynitrit ($OONO_2^-$) (McCall *et al.*, 1989). Glutathion und Ascorbat schützen die Neutrophilen hierbei vor der oxidativen Selbstzerstörung (Voetman *et al.*, 1980). Zu den nichtoxidati-

ven Mechanismen gehören die proteolytischen Enzyme, saccharolytischen Enzyme und die Defensine in den azurophilen Granula (Lehrer und Ganz, 1996), sowie Bindeproteine, Lysozym und Collagenase in den spezifischen Granula (Borregaard *et al.*, 1993). Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten bei der Abwehr von Pilzinfektionen wird durch die Beobachtung, dass Neutrophilendefekte zu chronischen Candidosen führen, untermauert (Mobacken *et al.*, 1977).

Zusammen bilden die Zellen in der Haut ein dichtes und hochwirksames Netz aus Verteidigungsfronten gegen beinahe jede Art von Bedrohung (Wagner und Sohnle, 1995).

1.3 Funktionen von Entzündungsmediatoren in der menschlichen Haut

Nahezu alle Zellen des Körpers, einschließlich der Zellen der Haut, sind in der Lage, endogene Entzündungsmediatoren zu produzieren (Schröder, 1995a). In der Haut werden Zytokine und Chemokine von Keratinozyten, dermalen Fibroblasten, Endothelzellen und Melanozyten abgegeben. Darüber hinaus setzen Leukozyten, die am Entzündungsherd ankommen, Botenstoffe frei, welche die Akkumulation und Aktivierung weiterer Zellen regulieren.

Für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten spielt das C-X-C Chemokin IL-8 eine wichtige Rolle (Schröder *et al.*, 1994). Als C-X-C Chemokine bezeichnet man Chemokine, die durch das gemeinsame strukturelle Motiv von vier Cysteinen an gleicher relativer Position gekennzeichnet sind. Diese Cysteine bilden zwei Disulfidbrücken, wobei die ersten beiden Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind (Matsushima und Oppenheim, 1989). Da IL-8 im Rahmen einer Entzündung von dermalen Zellen wie Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und Endothelzellen abgegeben wird, und neutrophile Granulozyten in pilzinfiziertes Gewebe einströmen (Dahl, 1987), ist es denkbar, dass IL-8 für die Regulierung der Abwehrreaktionen bei Dermatomykosen von entscheidender Bedeutung ist. Als primäre Zytokine bezeichnet man Entzündungsmediatoren, die eine Expression von sogenannten sekundären Zytokinen induzieren können. Die Stimulation mit den primären Zytokinen IL-1 α , IL-1 β oder TNF- α *in vitro* kann die Expression von IL-8 in den oben genannten dermalen Zellen anregen (Baggiolini *et al.*, 1994; Schröder *et al.*, 1994).

Das primäre Zytokin IL-1 α wird als inaktive Form in nicht entzündeter Haut von Keratinozyten produziert und gespeichert. Diese Zellen sind hingegen nicht in der Lage, es in die aktive Form überzuführen (Mizutani *et al.*, 1991). Auch für andere Entzündungsmediatoren wird die Möglichkeit der Einlagerung einer inaktiven Form in Zellen der Haut diskutiert. Inaktive Formen könnten im Fall einer Entzündung enzymatisch (im Fall von IL-1 α nicht innerhalb der Keratinozyten) in die aktive Form umgewandelt, und anschließend freigesetzt werden.

Keratinozyten produzieren nach Stimulation mit IFN- γ das C-X-C Chemokin IP-10 (Luster und Ravetch, 1987). Dieses Chemokin konnte in entzündeten Hautregionen nachgewiesen werden (Kaplan *et al.*, 1987). Rekombinantes IP-10 wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Lymphozyten jedoch nicht auf neutrophile Granulozyten (Dewald *et al.*, 1992; Taub *et al.*, 1993).

Für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten wird auch der Wachstumsfaktor Gro- α (Synonym: MGSA = melanoma growth-stimulatory activity factor) diskutiert. Dermale Zellen wie Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen exprimieren Gro- α nach Stimulation mit primären Zytokinen (Haskill *et al.*, 1990; Baggiolini *et al.*, 1994; Schröder *et al.*, 1994).

Neben den C-X-C Chemokinen werden von dermalen Zellen auch C-C Chemokine produziert: MCP-1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten (Baggiolini *et al.*,

1994) und wird als verantwortlich für die Rekrutierung dieser Zellen bei entzündlichen Hautkrankheiten diskutiert. RANTES wirkt chemotaktisch auf Gedächtnis-T-Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten, aber nicht auf neutrophile Granulozyten (Schall *et al.*, 1990). Da diese Zelltypen in entzündete Hautregionen einwandern, könnte RANTES wichtige regulatorische Funktionen übernehmen. Bei Pilzinfektionen spielt dieses Zytokin möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle, da die durch RANTES aktivierten Zellen nicht in Infiltraten bei Dermatomykosen nachweisbar waren (Dahl, 1994).

Neben ihrer chemotaktischen Wirkung auf verschiedene Effektorzellen beeinflussen Entzündungsmediatoren die Mikrozirkulation in der Haut und haben wachstumsfördernde, immunoregulatorische sowie zellprotektive Wirkungen. Entzündungsmediatoren übernehmen somit ein breites Spektrum wichtiger Rollen in Vorgängen der Zell-Zell-Kommunikation.

1.4 Fragestellung

Neutrophile Granulozyten sind eine der wichtigsten Komponenten bei der Verteidigung der Haut gegen Dermatophyten. Sie sind in der Lage, die Blutgefäße zu verlassen und durch das Gewebe bis zum Infektionsherd zu wandern, um dort den Dermatophyten unschädlich zu machen (Odds, 1988). Voraussetzung für diese Zellmigration ist das Vorhandensein einer Signalsubstanz, welche die neutrophilen Granulozyten zur Chemotaxis anregt. Werden Keratinozyten, Endothelzellen oder dermale Fibroblasten durch Substanzen aus Pilzen stimuliert, synthetisieren und sezernieren sie Chemotaxine wie IL-8 oder Gro- α , welche ihrerseits chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirken und die Bildung weiterer Zytokine induzieren (Schröder *et al.*, 1994).

Neben dieser indirekten Aktivierung von Effektorzellen durch endogene Chemotaxine sind auch exogene Substanzen bekannt, die neutrophile Granulozyten direkt aktivieren: Formylierte Methionyl-Peptide (FMLP) aus Bakterien aktivieren neutrophile Granulozyten direkt (Schiffmann *et al.*, 1975). In diesem Zusammenhang spricht man von sogenannten pathogenmusterassoziierten Molekülen (PAM), die exogener Natur sind und vom Wirtsorganismus erkannt werden (Janeway, Jr., 1992). Es ist denkbar, dass sich im Verlauf der Evolution ähnliche PAM-Erkennungsmechanismen zwischen Eukaryonten und Pilzen entwickelt haben.

Eine komplementvermittelte Antwort auf Pilze konnte nachgewiesen werden (Tagami *et al.*, 1982). Erste Hinweise auf eine direkte Aktivierung von Neutrophilen konnten durch Experimente mit Kulturüberständen von *Candida albicans* gesammelt werden (Cutler, 1977; Bojanovsky und Bals, 1980). Die chemische Natur der Substanzen wurde hierbei nicht weiter untersucht. Neuere Beobachtungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass verschiedene Dermatophyten und *Candida albicans* leukozytenaktivierende Substanzen enthalten (Kahlke, 1989; Brasch *et al.*, 1991a; Brasch *et al.*, 1991b; Brasch *et al.*, 1992).

Erste Charakterisierungsexperimente ergaben, dass die biologische Aktivität ausschließlich in der Lipidphase der Dermatophyten lokalisiert ist. Es handelt sich um ein Chemotaxin von geringer chemischer Stabilität, welches neben neutrophilen Granulozyten auch auf eosinophile Granulozyten und Monozyten *in vitro* chemotaktisch wirkt (Kahlke, 1993). Aufgrund ihrer biologischen und chemischen Eigenschaften wurde die Substanz LILA (Lipidartiger Leukozytenaktivator oder lipid-like leukocyte activator) genannt. Experimentell konnten Keratinozyten und Monozyten durch Stimulation mit LILA-Präparationen angeregt werden, verschiedene Zytokine freizusetzen (Kahlke, 1993). Neutrophile Granulozyten setz-

ten nach Stimulation mit LILA Myeloperoxidase, β -Glukuronidase, Elastase, toxische Sauerstoffmetabolite sowie LTB_4 und andere Arachidonsäuremetabolite frei (Kahlke, 1993; Kahlke *et al.*, 1996). Durch Absättigung der Chemotaxinrezeptoren auf neutrophilen Granulozyten mit bekannten Chemotaxinen konnte das LILA-Signal nicht deaktiviert werden. Diese Beobachtung spricht für die Existenz eines spezifischen LILA-Rezeptors auf neutrophilen Granulozyten (Kahlke, 1993).

Da die apathogene Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ebenfalls biologisch und chemisch ähnliche lipidartige Leukozytenaktivatoren enthält, konnten grössere Mengen isoliert und chromatographisch weiter aufgereinigt werden. In einem Deaktivierungsexperiment auf Ebene des Ca^{2+} -Einstromes zeigten sich keine Kreuzreaktivitäten zwischen LILA und bekannten Chemotaxinen wie 5-oxo-ETE, LTB_4 , PAF, C5a, IL-8 und FMLP (Bülow *et al.*, 1996). Erste Untersuchungen zur Signaltransduktion lieferten Hinweise auf einen G-Protein-vermittelten Prozess. Massenspektrometrische und kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen ergaben, dass 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin (Oleoyl-LPC) eine Komponente in LILA-Präparationen darstellt. Da synthetisches Oleoyl-LPC biologisch nicht aktiv war, musste eine andere Komponente in den LILA-Präparationen für die chemotaktische Aktivität verantwortlich sein (Bülow, 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Leukozytenaktivator weiter aufzureinigen, um mit Hilfe biochemischer und physikochemischer Techniken eine Aufklärung der LILA-Struktur zu ermöglichen. Als biologische Quelle für LILA sollte die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* dienen, die in großen Mengen verfügbar ist. Mit molekularbiologischen Techniken sollte der Frage nachgegangen werden, ob LILA die Genexpression neu entdeckter, auch gegen *Candida albicans* wirksamer antimikrobieller Peptide beeinflusst. Im Falle eines neuen Strukturvorschlags sollte die chemische Synthese von LILA versucht werden und natürliches sowie synthetisches LILA sollten für weitere Charakterisierungsexperimente verwendet werden. Darüber hinaus war es geplant, mit Hilfe von *in vitro* Modellsystemen zuletzt auch die Signaltransduktion von LILA zu untersuchen.

Fernziel des Projektes war es, durch die genaue Charakterisierung des LILA-Systems, Einblick in die bislang weitgehend unbekanntes Erkennungsmechanismen zu bekommen, die der Pilzabwehr der menschlichen Haut zugrunde liegen. Diese Erkenntnisse könnten später möglicherweise genutzt werden, um im klinischen Bereich einen effektiven Schutz vor Pilzen zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Acetonitril	Promochem GmbH, Wesel
<i>Bordetella pertussis</i> -Toxin	Calbiochem
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Diethylether	Fa. Rudolf Walter, Kiel
Dithiothreitol	Gibco, Eggenstein
DMEM	Gibco, Eggenstein
EGTA	Calbiochem
Ethanol	Merck, Darmstadt
FCS	Bioconcept, Umkirch
Ficoll-Lösung	Biochrom, Berlin
HPLC-Wasser	Promochem GmbH, Wesel
IL-8	PeproTech, Rocky Hill, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Ionomycin	Calbiochem
FURA-2/AM	Calbiochem
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
MEM	Gibco, Eggenstein
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin
Percoll-Lösung	Biochrom, Berlin
Primer	Pharmacia, Freiburg
Reverse Transcriptase Superscript™	Gibco, Eggenstein
Rnaseinhibitor RNasin	Gibco, Eggenstein
RPMI-1640	Gibco, Eggenstein
Saboraud-Agar	Bio-Merieux, Nürtingen
Taq-Polymerase	Gibco, Eggenstein
TNF-α	PeproTech, Rocky Hill, USA
Triton X-100, reduziert	Calbiochem
Trizol-Puffer	Gibco, Eggenstein
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco, Eggenstein

Alle übrigen Reagenzien ohne Angabe der Bezugsquelle sind bei der Firma Sigma-Chemie (Deisenhofen) erworben worden.

2.2 Verwendete Puffer und Medien

Auftragspuffer für Agarosegele:	50 % (v/v) Glycerol 1 % (w/v) Bromphenolblau 1 % (w/v) Xylenecyanol in TAE-Puffer (1 ×)
Elutiationspuffer, PBS mit folgenden Zusätzen:	100 mg/l (w/v) Na-EDTA 0,1 % (w/v) BSA
KP (Komplettpuffer), PBS mit folgenden Zusätzen:	0,9 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 0,1 % (w/v) BSA
Natriumhydrogencarbonatpuffer, pH 5	1 mM NaHCO ₃
Natriumhydrogencarbonatpuffer, pH 8	1 mM NaHCO ₃
PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Phospholipase C-Puffer, pH 7,4	10 mM Tris-HCl 144 mM NaCl max 0,03 % Triton X-100
Phospholipase D (VI) Puffer, pH 7,8	100 mM Tris-HCl 5 mM Ca ²⁺ 5 mM Mg ²⁺ 1 % Triton X-100
TAE-Puffer:	40 mM Tris/HCl 40 mM Essigsäure 1 mM Na ₂ EDTA
Tricin-Puffer, pH 8,5:	300 mM Tricin 20 mM MgCl ₂ 50 mM Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) Gelatine 1 % (w/v) Thesit

2.3 Verwendete Geräte

Coulter-Counter:	Channelyser C256, Coulter Electronics LTD, Kre-feld
Densitometer:	CD 60, Desaga, Heidelberg
Disintegrator:	Modell S, IMA, Zeppelinheim
Gelelektrophoresekammer:	Horizon 11.14, Life Technologies GmbH, Eggenstein
HPLC-Pumpe:	SP 8700, Spectra Physics, Hamburg
HPLC-Pumpe:	SP 8800, Spectra Physics, Hamburg
Integrator:	SP 4270, Spectra Physics, Hamburg
Integrator:	Integration auf einem IBM PS/2 Computer mit dem Programm Spectra Focus, Spectra Physics, Hamburg
Kamera	IBI, New Haven, USA
Lumineszenz-Spektrometer:	LS-50, Perkin Elmer, Hannover
Photometer:	Zweistrahl-Spektralphotometer HITACHI Modell 150-20, Colora Messtechnik, Lorch

Rotationsverdampfer:	Laborota 4000 Digital, mit regelbarer Vakuumpumpe und regelbarem Umlaufkühler, Hei-dolph, Kelheim
Säulenheizung:	SP 8792, Spectra Physics, Hamburg
Spannungsquelle:	Modell 200/20 Power Supply, BioRad, München
Thermoblock:	Trio Version 2.51BB, Biometra, Göttingen
Thermomixer:	Modell 5436, Eppendorf, Hamburg
Transilluminator:	Chroma 42, Vetter GmbH, Wiesloch
UV-Detektor:	Modell Spektroflow 783, Kratos
UV-Detektor:	Focus, Spectra Physics, Hamburg
Zentrifugen:	Megafuge 1.0 R, Minifuge RF, Biofuge fresco, Heraeus, Osterode; J2/21 ME, Beckmann, München

2.4 Verwendete Software

Beilstein Commander 4.0	Online-Datenbank zur Suche nach Strukturen und Reaktionen © 1998 Beilstein Informationssysteme GmbH
FL WinLab 2.1f	Steuer –und Auswertungsprogramm für Fluorimetrische Daten © 1998 Perkin Elmer, Hannover
Isoform 1.02	Programm zur Auswertung exakter Massen aus der Massenspektrometrie © 1995 US Secretary of Commerce on behalf of the United States, NIST
ISIS Draw 2.2	Programm zur Eingabe chemischer Strukturen und zur Berechnung von Molekül-daten © 1998 MDL Information Systems
Molecular Weight Calculator 5.09	Programm zur Berechnung der exakten Masse einer Summenformel © 1997 by Matthew Monroe
NIST MS-Search 1.5	Programm zur Zuordnung von Electron Impact-Spektren unbekannter Proben © 1996 National Institute of Standards and Technology
RasWin Molecular Graphics 2.5	Programm zur räumlichen Darstellung von Molekülen © 1994 R. Sayle

2.5 Präparation von Lipidextrakten aus Hefen

Für die Präparation von Lipidextrakten aus Hefen wurden ausschließlich mit Methanol gespülte Glasgefäße und Hamiltonspritzen verwendet. Der Kontakt der Lösungsmittel mit Kunststoffen wurde vermieden. Die Lösungsmittel Aceton und Diethylether wurden nach Gebrauch mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mehrfach zur Wiederverwendung redestilliert.

Die Homogenisation der Hefezellen erfolgte mit einem Disintegrator S. (IMA, Zeppelinheim). Dabei wurden 40 g Hefezellen (Asmussen, Elmshorn) in 50 ml PBS aufgenommen und bei Anwesenheit von Glaskugeln (Durchmesser 0,5 mm; 20 ml) bei 4000 rpm unter Eiskühlung für 30 min zermahlen. Die Zelltrümmer wurden von den gelösten Anteilen durch Zentrifugation (500 g, 4°C, 30 min) getrennt und separat weiterverarbeitet. Die im Überstand enthaltenen Lipide wurden mit Diethylether extrahiert. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln von je 100 ml Überstand mit 100 ml Diethylether in einem Scheidetrichter. Die wässrige Phase wurde verworfen.

Die im Zentrifugationsschritt abgetrennten Zellfragmente (Pellet) wurden mit der fünffachen Menge Aceton versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der lipidhaltige Acetonüberstand von den Zellfragmenten durch Sedimentation unter Eiskühlung abgetrennt. Aus dieser Lösung wurde das Aceton mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt (Vakuum: 200 mbar; Badtemperatur: 35°C; 60 rpm). Mit Diethylether wurden aus der verbliebenen wässrigen Lösung die Lipide extrahiert. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln von je 100 ml wässriger Phase mit 100 ml Diethylether in einem Scheidetrichter.

Die beiden organischen Phasen (aus Überstand und Pellet der Zentrifugation) wurden vereinigt und mehrfach mit einer NaHCO₃-Lösung (1 mM; pH 8) gewaschen. Hierzu wurde zu je 400 ml organischer Phase in einem Scheidetrichter 100 ml Puffer zugegeben, und anschließend ausgeschüttelt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Anschließend wurden mit einer NaHCO₃-Lösung (1 mM; pH 13) die pH 13-löslichen Lipide aus der organischen Phase extrahiert. Die Extraktion erfolgte durch Ausschütteln von je 500 ml organischer Phase mit 100 ml Puffer in einem Scheidetrichter. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Um eine bessere Phasentrennung zu erreichen, wurde der Puffer mit NaCl gesättigt. Die lipidhaltige wässrige Phase wurde anschließend mit 1 M Zitronensäure auf pH 5 angesäuert. Aus dieser Lösung wurden die Lipide durch Ausschütteln von je 500 ml wässriger Lösung mit 100 ml Diethylether extrahiert. Der Ether wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt und die verbleibenden Lipide bis zur weiteren Verwendung bei -20°C unter Argon gelagert.

2.6 Chromatographische Reinigung der Lipidextrakte

Die chromatographische Trennung der Lipide erfolgte mit den unter Tabelle 2-1 (Seite 16) aufgeführten Bedingungen. Um die biologische Aktivität der einzelnen Fraktionen zu überprüfen, wurde zunächst 10 µl eines Komplettpuffers in eine Kammer einer Rundbodenmikrotiterplatte vorgelegt und anschließend ein Aliquot der HPLC-Fraktion (10-100 µl) zugegeben. Um das Lösungsmittel aus dem Testansatz zu entfernen, wurden die Proben gefriergetrocknet (-80°C; 0,005 mbar).

Die biologische Aktivität wurde nach der unter 2.8.3 (Seite 21) beschriebenen Methode zur Messung der Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten bestimmt. Fraktionen mit biologisch aktiven Lipiden wurden grundsätzlich lyophilisiert und anschließend bei -20°C unter Argon in gelagert. Zur Lagerung der gereinigten Lipide wurden Glasgefäße mit teflonbeschichteten Deckeln verwendet (Wheaton, Mellville, USA).

	Zu trennende Substanzen	Säule	Laufmittel	Gradient		
				Zeit [min]	A [%]	B [%]
I)	pH 13-lösliche Lipidextrakte , 1. Trennschritt, Bülow, 1997	Präparative RP-8; 500 mM x 1/2, 10-7C ₈ (Macherey & Nagel)	A: CH ₃ CN	0	10	90
			+0,1% TFA	10	50	50
			B: H ₂ O	20	70	30
			+0,1% TFA	35	100	0
				50	100	0
II)	chromatographisch vorgereinigte Lipide 2. Trennschritt (Creer und Gross, 1985)	Nucleosil 250 mm x 4; 120-5 C ₁₈ (Macherey & Nagel)	57% CH ₃ OH 23% H ₂ O 20% CH ₃ CN	isokratisch, 30 min		
III)	chromatographisch vorgereinigte Lipide 3. Trennschritt	Nucleosil 250 mm x 4; 120-5 C ₁₈ (Macherey & Nagel)	A: CH ₃ CN	0	10	90
			+0,1% TFA	10	50	50
			B: H ₂ O	20	70	30
			+0,1% TFA	35	100	0
				50	100	0
IV)	schnelle Trennung von Synthesepro- dukten bis R = C ₁₈	Präparative RP-8; 500 mM x 1/2, 10-7C ₈ (Macherey & Nagel)	A: CH ₃ CN	0	50	50
			+0,1% TFA	7,5	70	30
			B: H ₂ O	15	100	0
			+0,1% TFA	25	100	0
V)	Trennung von Syntheseprodukten mit R = Erucoyl- säure	Präparative RP-8; 500 mM x 1/2, 10-7C ₈ (Macherey & Nagel)	A: CH ₃ CN +0,1% TFA B: H ₂ O +0,1% TFA	0 10 20 60	10 80 100 100	90 20 0 0

Tabelle 2-1: Verwendete HPLC-Systeme mit zugehörigen Parametern. Alle verwendeten HPLC-Systeme wurden ohne Vorsäule eingesetzt. Fraktionierung: 1 Fraktion/Minute

2.7 Präparation von Lipidextrakten aus anderen Organismen

Die Präparation von pH 13-löslichen Lipidextrakten aus pflanzlichem und tierischem Material und deren weitere chromatographische Aufreinigung erfolgte wie die Präparation von Lipiden aus Hefe (2.5). Der Aufschluss des Materials musste entsprechend angepasst werden: Im Fall des menschlichen Vollblutes wurden die Zellen nicht aufgeschlossen, sondern direkt mit Aceton extrahiert. Lecithinextrakte aus Sojabohnen wurden ebenfalls direkt mit Aceton extrahiert. Die Präparation von Lipidextrakten aus der Hefe *Pichia pastoris* erfolgte nach dem für *Saccharomyces cerevisiae* beschriebenen Verfahren (2.5).

2.8 Methoden zur Überprüfung der biologischen Aktivität

Das erste Kriterium für die Identifikation der isolierten oder synthetisierten Substanzen war deren biologische Aktivität. Die biologische Aktivität einer Substanz wurde an neutrophilen Granulozyten untersucht: Induktion der Chemotaxis, Aktivierung der Freisetzung der Myeloperoxidase und intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung.

2.8.1 Isolierung von Leukozyten aus venösem Blut

2.8.1.1 Isolierung von Neutrophilen Granulozyten

Die in der Arbeit verwendeten neutrophilen Granulozyten wurden nach der von Henson (Henson, 1971) beschriebenen und von Kawohl (Kawohl *et al.*, 1980) modifizierten Methode aus frischem Venenblut gewonnen:

Frisch gewonnenes Vollblut wurde mit einer Citrat-Dextran Lösung versetzt (20 % vol/vol; 0,085 M Natriumcitrat, 0,065 M Citrat in 2%iger Dextran-T70 Lösung) und 20 min bei Raumtemperatur mit 550 x g zentrifugiert. Von den resultierenden zwei Phasen wurde die obere verworfen und die untere mit einer Gelatinelösung 1:1 (vol/vol) vermischt (2,5% Gelatine, 0,9% NaCl), und anschließend 30 min bei 37°C inkubiert. Die im entstandenen Überstand enthaltenen Zellen wurden bei 550 x g (RT) abzentrifugiert und nachfolgend in einer NH₄Cl-Lösung (0,85%; pH 7) resuspendiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Nach mehrfachem Waschen mit PBS (4°C) wurden die Zellen für weitere Untersuchungen eingesetzt oder für maximal 4 h bei 4°C gelagert.

2.8.1.2 Isolierung von Monozyten

Zur Gewinnung von Monozyten wurde frisches venöses Vollblut mit 1 mM Na-EDTA (pH 7,4) versetzt und über eine Ficoll-Lösung geschichtet (Boyum, 1968; Mrowietz und Ternowitz, 1987). Anschließend wurde der Ansatz 30 min bei 400 x g und 20°C zentrifugiert (ohne Bremse). Die im Pellet enthaltenen mononukleären Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in Elutrationpuffer aufgenommen. Um die Monozyten von den übrigen mononukleären Zellen zu trennen, wurde eine Gegenstrom-Zentrifugations-Elutration mit Hilfe einer Beckmann J2-21M/E Zentrifuge mit JE-6B Elutriator Rotor und Standard-Trennkammer (Zheng *et al.*, 1991) durchgeführt. Eine Lagerung der Monozyten erfolgte nach einer Zentrifugation (10 min, 200 g, 4°C) in Komplettpuffer bei 4°C.

2.8.2 Untersuchung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten

Zur Ermittlung chemotaktischer Aktivität von Lipidmediatoren für neutrophile Granulozyten wurde der indirekte Chemotaxis-Test von Boyden (Boyden, 1962) verwendet, der von der Arbeitsgruppe um Schröder (Schröder, 1997) modifiziert wurde.

Der Stimulus wurde in 100 µl Komplettpuffer aufgenommen und in das untere Kompartiment der Boydenkammer (BioRad GmbH, München) gefüllt. In das obere Kompartiment wurden 100 µl einer Zellsuspension (2×10^6 Zellen pro ml Komplettpuffer + 0,1 % BSA) gegeben. Die beiden Kompartimente wurden durch einen Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 3 µm (Nucleopore, Tübingen) voneinander getrennt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre wurden die Kammern geöffnet und die Filter abgenommen. Die auf den Filtern verbliebenen Zellen wurden mit 10 µl einer Triton-X-100-Lösung (0,1 %) lysiert. Das Lysat der migrierten Zellen wurde in eine Flachbodenmikrotiterplatte überführt und mit 100 µl einer p-Nitrophenyl-β-D-glukuronidlösung (0,01 M) in einer 0,1 M Natriumacetatlösung (pH 4,0) versetzt. Die enzymatische Reaktion der β-Glukuronidase wurde nach 18 Stunden Inkubationszeit bei 37°C mit 100 µl Glycinpuffer (0,4 M, pH 10) abgestoppt. Die Quantifizierung der migrierten PMN erfolgte indirekt durch Messung der Extinktion in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 405$ nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm (Creamer *et al.*, 1983).

Mit Hilfe einer Eichkurve wurde die gemessene Extinktion der Anzahl der in das untere Kompartiment der Boydenkammer gewanderten Zellen zugeordnet. Als Positivkontrolle diente N-Formyl-Norleucyl-Leucyl-Phenylalanin (FNLP, ein synthetisches Äquivalent zu FMLP) in unterschiedlichen Konzentrationen. Als Negativkontrolle diente die Stimulation mit Komplettbuffer. Die Zahl der in der Negativkontrolle gewanderten Zellen entspricht der Zahl der zufällig migrierten Neutrophilen (Keller und Sorkin, 1968).

Als Maß für die chemotaktische Aktivität wurde der chemotaktische Index angegeben:

$$\text{chemotaktischer Index} = \frac{\text{Anzahl der gerichtet gewanderten Zellen}}{\text{Anzahl der ungerichtet gewanderten Zellen}}$$

Da für die aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierten Lipide zu Beginn der Arbeit Werte wie molarer Extinktionskoeffizient und Molekulargewicht noch unbekannt waren, wurden für die eingesetzten Stimuluskonzentrationen relative Werte angegeben: Die Stimuluskonzentration, die eine halbmaximale Chemotaxis auslöste (bei 2×10^5 Zellen pro Boydenkammer), wurde zunächst als eine chemotaktische Aktivitäts-Einheit pro 100 μl Kammervolumen definiert und als Molarität angegeben (ED₅₀-Dosis).

2.8.3 Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten

Die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten wurde wie bei Preissner *et al.* (Preissner *et al.*, 1983) und Schröder *et al.* (Schröder *et al.*, 1987) beschrieben bestimmt.

Eine Zellsuspension aus neutrophilen Granulozyten (Zelldichte: 10^7 Zellen/ml) wurde mit Cytochalasin B (Endkonzentration 5 $\mu\text{g/ml}$) 5 min bei 37°C vorinkubiert (Goldstein *et al.*, 1973). Lyophilisierte Chemotaxinproben wurden in 100 μl PBS resuspendiert, in die Kammer einer Rundbodenmikrotiterplatte vorgelegt und ebenfalls für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Als Positivkontrollen dienten zwei Proben 100 μl 10^{-7} M FNLP und als Negativkontrollen zwei Proben 100 μl PBS pro Messung. Anschließend wurden jeweils 100 μl der Zellsuspension zu jeder Chemotaxinprobe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min erfolgte das Abzentrifugieren der Zellen bei 550 x g (10 min, Raumtemperatur). Jeweils 100 μl der aus jeder Kavität gewonnenen zellfreien Überstände wurden in die Kammern einer Flachbodenmikrotiterplatte übergeführt, mit 100 μl einer 0,01 M o-Phenylendiamindihydrochloridlösung in 0,1 M Citrat-Phosphatpuffer (pH 5.0) mit 0,001 % H₂O₂ versetzt. Die Farbreaktion erfolgte unter Lichtabschluss bis zur deutlichen Einfärbung der Positiv-Kontrolle (2-5 min). Durch Zugabe einer 2M H₂SO₄-Lösung wurde die enzymatische Reaktion gestoppt.

Anschließend wurde die Extinktion in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei $\lambda = 486$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 650$ nm gemessen. Als Totalkontrolle diente die freigesetzte Enzymmenge nach vollständiger Lyse der Zellen. Hierzu wurden 10^6 Zellen in 100 μl Komplettbuffer mit 100 μl einer Triton-X-100-Lösung (0,1%) versetzt, und die freigesetzte Enzymmenge anschließend wie oben beschrieben quantifiziert.

Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden nach der Quantifizierung 10 μl des Zellpellets mit 10 μl einer Trypanblaulösung versetzt. Mikroskopisch erschienen lysierte Zellen nach dieser Behandlung blau, vitale Zellen dagegen farblos.

2.8.4 Messung des Kalziumeinstromes in neutrophilen Granulozyten

Zur Messung des Ca^{2+} -Einstromes wurden zunächst neutrophile Granulozyten wie unter 2.8.1.1 (Seite 20) beschrieben isoliert und auf eine Zellkonzentration von 45×10^6 Zellen/ml (in PBS) eingestellt. Die hohe Zellzahl dient der Inhibition einer Mikropräzipitation des Fluoreszenzfarbstoffes (Hallett *et al.*, 1996). Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur mit $5 \mu\text{M}$ FURA-2/AM beladen. Intrazelluläre Esterasen spalten den Acetoxymethylester (AM) von FURA-2/AM ab, wodurch einerseits der Farbstoff nicht mehr membrangängig ist und andererseits die Ca^{2+} -Bindestelle freigegeben wird. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Kurz vor der Messung wurden die Zellen (5×10^6 Zellen/ml) in PBS-Puffer, der 1 mM CaCl_2 enthielt gelöst. Die Messung erfolgte in einer auf 37°C temperierten Quarzküvette unter ständigem Rühren. Die Anregungswellenlängen für FURA-2 betragen 340 nm (Ca^{2+} -gebundene Form) und 380 nm (Ca^{2+} ungebundene Form). Die Emissionswellenlänge beträgt für beide Formen 505 nm .

Jede Messung bestand aus vier Schritten:

- 1) Äquilibrieren der Zellen, um die Ca^{2+} -Konzentration ruhender Zellen festzulegen.
- 2) Zugabe des Stimulus.
- 3) Zugabe von $20 \mu\text{M}$ Ionomycin zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenzintensität (alle FURA-2 Moleküle sind mit Ca^{2+} assoziiert).
- 4) Zugabe von $50 \mu\text{M}$ Triton X-100 und $40 \mu\text{M}$ EGTA zur Bestimmung der minimalen Fluoreszenzintensität (alle FURA-2 Moleküle liegen in der freien Form vor).

Die Fluoreszenzwerte wurden mittels der Grynkiewicz-Formel (Grynkiewicz *et al.*, 1985) einer Kalziumionenkonzentration zugeordnet:

$$[\text{Ca}^{2+}]_t = K_{d_{\text{FURA-2/AM}}} \cdot \frac{R_t - R_{\min}}{R_{\max} - R_t} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

$[\text{Ca}^{2+}]_t$	Kalziumionenkonzentration zur Zeit t
K_d	Dissoziationskonstante des Fluoreszenzfarbstoffes, für FURA-2: 224 nm .
R_{\max}	maximales Fluoreszenzverhältnis (Ratio) ($340/380 \text{ nm}$)
R_{\min}	minimale Ratio
R_t	Ratio zur Zeit t
S_{b2}	Fluoreszenzintensität der gebundenen Form bei 380 nm
S_{f2}	Fluoreszenzintensität der freien Form bei 380 nm

Die Kalibrierung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms FL WinLab 2.1f von Perkin Elmer, Hannover.

2.8.5 Untersuchung der Signaltransduktion in neutrophilen Granulozyten

Die Untersuchungen zur Signaltransduktion beruhten auf dem Einsatz von Inhibitoren einzelner, für verschiedene Signaltransduktionsschritte erforderlicher, Proteine.

Acetyl-Geranyl-Geranyl-Cystein (AGGC) inhibiert die membranassoziierte Carboxylmethyltransferase in neutrophilen Granulozyten (Philips *et al.*, 1993). Eine 0,1 M AGGC-Lösung (Lösungsmittel: DMSO) wurde mit PBS verdünnt (1:10) und während der Messung in die Küvette gegeben (Endkonzentration: 5 μ M).

DL- α Hydroxymyristoilsäure (HMA) hemmt die N-Myristoyl-Transferase (NMT) (Nadler *et al.*, 1993). 20 μ l der Säure wurden in 200 μ l 0,3 N NaOH gelöst, mit 150 μ l 0,3 N HCl neutralisiert, mit 50 μ l PBS (pH 7,5) und zuletzt mit 40 mg BSA versetzt. Die Inhibition der N-Myristoyl-Transferase erfolgte durch Zugabe von HMA-beladenem BSA während der Messung in die Küvette (1 mM Endkonzentration).

Phorbol Myristat Acetat (PMA) hemmt die membranassoziierte Phospholipase C in PMN (Naccache *et al.*, 1985). Eine PMA-Lösung (4 mM in DMSO) wurde kurz vor der Messung mit PBS (pH 7,5) verdünnt (1:7) und während der Messung in die Küvette gegeben (100 nM Endkonzentration).

Bordetella pertussis-Toxin (PTX) hemmt G-Proteine (Hazes *et al.*, 1996). Das Beladen der PMN mit PTX erfolgte durch Inkubation der Zellen (Zelldichte : 45 x 10⁶ Zellen/ml) mit PTX (4 μ g/ml) für 2 h bei 37°C. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne PTX bei gleichen Bedingungen gelagert worden waren.

U-73122 ist ein selektiver Hemmstoff der Phospholipase C (Tatrai *et al.*, 1994). Neutrophile Granulozyten (Zelldichte : 45 x 10⁶ Zellen/ml) wurden 30 min bei 37°C mit 7 μ M U-73122 inkubiert. U-73343 stellt das inaktive Analogon zu U-73122 dar (Tatrai *et al.*, 1994) und wurde wie U-73122 eingesetzt.

2.9 Abbau von Phosphocholinen durch Phospholipase C und D

Um die in LILA-Präparationen enthaltenen Phosphatidylcholine zu spalten, wurden verschiedene Phospholipasen eingesetzt. Hierzu wurde ein Extrakt pH 13-löslicher Lipide (Präparation wie unter 2.5, Seite 17 beschrieben) aus *Saccharomyces cerevisiae* in Ethanol aufgenommen (100 μ l Extrakt in 200 μ l Ethanol). In das Reaktionsgefäß wurden 10 ml NaHCO₃-Puffer (1 mM; pH 13) vorgelegt und die Ethanol-Lipid-Lösung zugegeben. Anschließend erfolgte eine schrittweise Ansäuerung des Versuchsansatzes mit HCl (0,3 mM) auf pH 7,4 (Phospholipase C) beziehungsweise auf pH 7,8 (Phospholipase D). Danach wurde Phospholipase C-Puffer (10 x) beziehungsweise Phospholipase D-Puffer (10 x) zugegeben (Gesamtvolumen des Versuchsansatzes : Puffer = 1 : 10). Nach Zugabe von 5 U Phospholipase C beziehungsweise 100 U Phospholipase D Typ VI erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 90 min.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der enzymatische Abbau der Phosphocholine durch Ansäuern der Probe auf pH 5 gestoppt, die Lipide mit Diethylether aus der Probe extrahiert und das Etherextrakt mit Hilfe eines Rotationsverdampfers eingeengt (20°C; 450 mbar). Bis zur weiteren Verwendung konnten die extrahierten Lipide bei -20°C unter Argon gelagert werden.

In einem weiteren Experiment zum Abbau von Phosphocholinen durch Phospholipase D Typ VI wurden unterschiedliche Konzentrationen von HPLC-gereinigten LILA-Präparationen mit unterschiedlichen Phospholipasekonzentrationen inkubiert. Der Versuchsablauf entspricht dem oben beschriebenen.

2.10 Massenspektrometrische Untersuchungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Prof. Anthony I. Mallet (School of Chemical and Life Sciences, University of Greenwich, England) durchgeführt. Zur Untersuchung wurden ausschließlich Proben eingesetzt, die mit zwei unterschiedlichen HPLC-Systemen gereinigt wurden (Tabelle 2-1, Seite 19, HPLC-System I und System II).

2.10.1 Massenspektrometrische Analysen mittels Fast Atom Bombardment-Ionisation (FAB)

Um die in den LILA-Präparationen enthaltenen Moleküle schonend zu ionisieren, wurde die FAB-Technik eingesetzt. Hierbei wurde die Probe in einem Gemisch aus CHCl_3 und CH_3OH (1:1) auf die Matrix aufgetragen. Anschließend wurde ein Cs^+ -Strahl mit 35 kV auf die Probe geleitet.

Durch diese Ionisationsmethode konnten Molekülionen (MH^+ und MNa^+ , wobei das Na^+ aus der verwendeten Matrix stammt) bei Probenmengen im Bereich 1-10 ng detektiert werden.

2.10.2 Massenspektrometrische Analysen mittels Electron Impact-Ionisation (EI)

Um ein spezifisches Fragmentierungsmuster der in LILA-Präparationen enthaltenen Molekülen zu erhalten wurde die "Electron Impact" Ionisationsmethode verwendet. Die Probe wurde in einem Gemisch aus CHCl_3 und CH_3OH (1:1) auf den Probenhalter aufgetragen und anschließend auf 100°C erhitzt. Die Detektion der Molekülfragmente erfolgte während einer schrittweisen Temperaturerhöhung von 100°C auf 150°C . Die resultierenden Fragmentierungsmuster wurden mit Hilfe einer computerunterstützten Datenbanksuche (NIST MS-Search 1.5) bereits bekannten Strukturen zugeordnet.

2.10.3 Massenspektrometrische Analysen mittels Electrospray Ionisation (ESI)

Eine schonende Ionisationsmethode stellt die Electrospray Ionisation (ESI) dar. Hierbei werden durch Sprühen der Probenlösung kleine Tröpfchen erzeugt, die mit einer Ladung versehen werden. Diese geladenen Tröpfchen werden durch elektromagnetische Felder weiter beschleunigt und in kleinere Tröpfchen aufgeteilt. Die Fragmentierungsmuster können durch unterschiedliche Beschleunigungsspannungen der Blenden (Cone-Voltages) beeinflusst werden. Die Probe wurde in einem Gemisch aus CHCl_3 und CH_3OH (1:1) gelöst und in die Probenkammer eingespritzt. Zum Einsatz kamen hierbei Beschleunigungsspannungen von 35 V und 60 V.

2.10.4 Analysemethoden mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie mit anschließender Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Bei der hier verwendeten HPLC-MS handelt es sich um eine Flüssigkeitschromatographie mit nachgeschalteter ESI (2.10.3), in der die Fraktion direkt versprüht wird. Die Probe wurde in einem Acetonitril-Wasser-Gemisch gelöst, das der Anfangskonzentration des HPLC-Laufmittelgradienten entsprach (90% H₂O / 10% CH₃CN). Zur chromatographischen Trennung wurde eine C₈-Säule und ein Acetonitril-Gradient mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min verwendet (System I, Tabelle 2-1).

2.10.5 Bestimmung der exakten Masse

Zur Bestimmung der exakten Masse wurde ein interner Standard verwendet, dessen exakte Masse bekannt war, und dessen Molekulargewicht in der Nähe der zu untersuchenden Substanz lag. Den ermittelten Werten wurden anschließend mit Hilfe der Programme Molecular Weight Calculator 5.09 und Isoform 1.02 möglichen Summenformeln zugeordnet. Mit zunehmender Molekülmasse steigt hierbei die Fehlerrate der exakten Masse und somit auch die Anzahl der möglichen Summenformeln.

2.11 Kernspinresonanzspektroskopische Untersuchungen

Die zur Strukturaufklärung eingesetzte ¹H-NMR wurde von Prof. Anthony I. Mallet (School of Chemical and Life Sciences, University of Greenwich, England) durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem 600 MHz-Gerät, als Lösungsmittel diente CDCl₃.

2.12 Herstellung von Bis-acyl-harnstoffderivaten

Zur Synthese von Bis-palmitoleoyl-harnstoffen wurde 20 mg Harnstoff in 1 ml CH₃CN bei 80°C gelöst. Nach Zugabe von 137 µl Triethylamin (entsprechend 100 mg) und 270 mg Palmitoleinsäurechlorid wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren für 90 min auf 82°C erhitzt. Das Entfernen des Acetonitrils erfolgte nach Abkühlen des Reaktionsgemisches mittels eines Rotationsverdampfers (40°C; 230 mbar). Durch Extraktion mit Diethylether wurden die Reaktionsprodukte von Salzen getrennt. Nach Einengen der organischen Phase wurde der Rückstand chromatographisch getrennt (RP-8-Säule; CH₃CH-Gradient HPLC-System I; Tabelle 2-1, Seite 19). Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 32 min enthielt die synthetischen Bis-palmitoleoyl-harnstoffe. Einen alternativen Reaktionsweg stellte die Verwendung von Pyridin statt Triethylamin dar. Hierbei wurden 80 µl Pyridin (entsprechend 78 mg) statt Triethylamin zugesetzt.

Um Bis-linoyl-harnstoffe herzustellen, wurden die selben Bedingungen wie zur Herstellung von Bis-palmitoleoyl-harnstoffen gewählt. Statt Palmitoleinsäurechlorid wurden 318 µl Linolsäurechlorid (entsprechend 296 mg) zugegeben.

2.13 Synthese von Mono-acyl-harnstoffen

Zur Synthese von Mono-palmitoleoyl-harnstoff wurde 20 mg Harnstoff in 1 ml CH₃CN bei 80°C gelöst. Nach Zugabe von 68 µl Triethylamin (entsprechend 100 mg) und 135 mg Palmitoleinsäurechlorid wurde das Reaktionsgemisch unter Rühren für 90 min auf 82°C erhitzt. Das Entfernen des Acetonitrils erfolgte nach Abkühlen des Reaktionsgemisches mittels eines Rotationsverdampfers (40°C; 230 mbar). Durch Extraktion mit Diethylether wurden die Reaktionsprodukte von Salzen getrennt. Nach Einengen der organischen Phase wurde der Rückstand

chromatographisch getrennt (RP-8-Säule; CH₃CH-Gradient HPLC-System I; Tabelle 2-1, Seite 19). Die Fraktion mit einer Retentionszeit von 17 min enthält den synthetischen Mono-palmitoleoyl-harnstoff. Einen alternativen Reaktionsweg stellt die Verwendung von Pyridin statt Triethylamin dar. Hierbei wurden 40 µl Pyridin (entsprechend 39 mg) statt Tryethylamin zugesetzt.

2.14 Erstellen einer Eichkurve zur Mengenbestimmung über HPLC

Die Integrationsfläche eines HPLC-Peaks ist innerhalb des Absorptionsintervalls 0-1 proportional zur gleichzeitig eluierten Stoffmenge. Um eine Eichkurve zu erstellen, wurden mehrfach unterschiedliche, definierte Stoffmengen in einem HPLC-System aufgetragen und die Peakfläche bei $\lambda = 203$ nm ermittelt. Aus den so erhaltenen Messpunkten konnte eine Eichgerade erstellt werden. Zu beachten war hierbei, gewählte Parameter wie Messweite des Detektors und Spreizung des Integrators zu berücksichtigen (Eine Verdopplung der Detektor-Range führt zu einer Halbierung der Integrationseinheiten).

2.15 Zellkultursysteme

2.15.1 Keratinozytenzelllinien

In dieser Arbeit wurde die Epithelzelllinie HaCaT (Boukamp *et al.*, 1988) für die Untersuchung stimulusabhängiger Expressionsveränderungen verwendet.

Die HaCaT-Zelllinie wurde zunächst in „DULBECCO's modified EAGLE medium“ (DMEM, GIBCO, Eggenstein) mit 10 % hitzeinaktivierten (56°C, 60 min) fötalem Kälberserum (FCS, GIBCO) und wasserdampfgesättigter CO₂-Atmosphäre (5 % CO₂) in 175 cm² Kulturflaschen (Sarstedt, Newton, USA) bei 37°C kultiviert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeweils 24 h nach der Aussaat der Zellen und anschließend alle weitere 3 Tage. Zellen, die nach 5-7 Tagen subkonfluent gewachsen waren, wurden mehrfach mit PBS gespült und unter Zugabe von KGM (Clonetics Corp., San Diego) für 1-2 Tage bis zur Konfluenz kultiviert.

2.15.2 Primäre humane Keratinozytenzellkulturen

Um humane Keratinozyten zu kultivieren, mussten diese zunächst aus menschlichen Vorhäuten isoliert werden. Das Gewebe wurde postoperativ maximal 10 Stunden in L15-Medium (Sigma) bei 4°C gelagert. Binde- und Fettgewebsanteile wurden zunächst präparativ entfernt. Anschließend wurde die Haut in schmale Streifen geschnitten und über Nacht in einer Trypsinlösung (0,25 %) bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von FCS (10 % w/v in L-15 Medium) wurde die Proteinaseaktivität gestoppt. Die von der Haut abgelöste Epidermis wurde abpräpariert und die erhaltene Zellsuspension mehrfach mit PBS gewaschen.

Die anschließende Kultivierung erfolgte in KBM-Medium (Clonetics Corp., San Diego) mit Zusatz von „epidermal growth factor“ (EGF) ohne Serumzusatz. Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeweils 3 Tage nach der Aussaat. Bevor die Zellen die Konfluenz erreichten, wurden sie mehrfach mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend durch Zugabe von 0,3 % (w/v) EDTA in PBS (Cell Dissociation solution, Sigma, Deisenhofen) von der Oberfläche gelöst. Nach Inkubation für 10 min bei 37°C in dieser Lösung wurden die Zellen zweimal in KBM-Medium gewaschen und auf der dreifachen Fläche ausgesät (Passage). Die Reinheit der Zellpopulationen wurde mikroskopisch überprüft um mögliche Kontamination durch Fibroblasten auszuschließen. Für weitere Versuche wurden ausschließlich Kulturen verwendet, die einen Mindestanteil von 90% Keratinozyten aufwiesen.

2.15.3 Stimulation von Zellkulturen mit Lipiden

12-24 Stunden vor der Stimulation wurde das Wachstumsmedium gegen Stimulationsmedium ausgetauscht. Die Stimulation von Zellkulturen erfolgte mit einer in Ethanol gelösten LILA-Präparation. Die Endkonzentration des Ethanols im Stimulationsmedium betrug maximal 1% (v/v). Als Kontrollexperiment wurden die Zellen jeweils mit der selben Ethanolmenge bzw. mit Medium stimuliert.

Alternativ konnten LILA-Präparationen auch statt in Ethanol in einem wässrigen System gelöst werden: Hierzu wurde eine definierte Menge LILA in alkalischem Puffer (pH 13) gelöst und anschließend mit HCl schrittweise auf pH 7 neutralisiert. Die so erhaltene Lösung wurde wie die Ethanollösung verwendet.

2.16 Messung der mRNA-Expression

2.16.1 Isolierung der mRNA

Um die Gesamt-RNA aus kultivierten Keratinozyten zu isolieren, wurde das TRIzol™-Reagenz (Gibco BRL, Eggenstein), verwendet. Die RNA-Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt:

Zuerst wurde das Zellmedium abgesaugt und die Keratinozyten zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml TRIzol™ je Loch auf einer 6-Loch-Platte (5 ml TRIzol™ / 75 cm²) wurden die Keratinozyten lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden je 200 µl CHCl₃ pro ml Zell-Lysat zugegeben. Die Lösung wurde anschließend bei 11500 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Isopropanollösung bei 11500 x g für 10 min abzentrifugiert und mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Die darin enthaltene RNA-Menge wurde durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 260$ nm ermittelt. Hierbei entspricht 1 Absorptionseinheit einer RNA-Konzentration von 42,1 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

2.16.2 Reverse Transkription

Von der zuvor isolierten mRNA wurden 2 µg mit 2,5 µl Oligo(dT)-Adaptor-Primer (20 µM) versetzt und auf 12 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Nach 10 min bei 70°C wurde der Versuchsansatz sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 µl 5×Reaktionspuffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl Reverse Transkriptase Superscript™ II (200 U/ µl) zugegeben. Nach 1 h bei 42°C wurde die Reaktion durch Erhitzen (90°C für 5 min) gestoppt. Der Versuchsansatz wurde mit H₂O auf 200 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.16.3 Duplex-PCR

Als Duplex-PCR bezeichnet man eine Polymerase-Kettenreaktion, bei der neben dem zu untersuchenden DNA-Fragment ein interner Standard mitamplifiziert wird. Als Standard wurde in diesem Falle die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Dieses Genprodukt wird konstant exprimiert, man nennt es daher auch „housekeeping gene“. Die zugehörigen Primer sind unter 2.16.5, Seite 28 aufgeführt.

5 µl cDNA (entsprechen ca. 50 ng RNA) wurden mit 5 µl Tricine-Puffer (10 x), 5 µl dNTPs (2 mM), 2,5 µl F-Primer (10 µM), 2,5 µl R-Primer (10 µM), 1 µl Primer GA1 (1 µM), 1 µl Primer GA2 (1 µM) und 18 µl H₂O versetzt. Dieser Versuchsansatz wurde mit 2 Tropfen Wachs überschichtet und sofort auf Eis ge-

stellt. Anschließend wurde 10 µl Taq-Polymerase (0,5 U in 10 x Tricine Puffer) auf das Wachs (Chill-out 14™) im Reaktionsgefäß gegeben. Tabelle 2-2 listet die Parameter für das verwendete PCR-Programm auf. Eingesetzt wurde ein Trio-Block-Thermocycler (Biometra, Göttingen).

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklus- zahl
94	1	30
60	0,5	
72	1	
72	3	
4	∞	

Tabelle 2-2: Parameter des verwendeten PCR-Programmes

Nach Ablauf des PCR-Programmes wurden die Produkte entweder mittels Agarosegelelektrophorese getrennt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.16.4 Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung und Auswertung der entstandenen Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

Für ein 1,5% Agarosegel wurden 1,5 g Agarose (bzw. 2 g Agarose für ein 2% Agarosegel) in 100 ml TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, und mit 8 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt. Nach dem Giessen und Aushärten des Gels wurden je 9 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl DNA-Auftragspuffer aufgetragen und in einer horizontalen Gelapparatur (Horizon 11-14; Gibco BRL) elektrophoretisch bei 90 V getrennt. Als Grössenstandard dienten 4 µl einer Ready-Load™-100 bp Leiter (Gibco BRL).

Nach der Trennung wurden die Banden photographiert ($\lambda = 366$ nm; UV-Transilluminator: Chroma 42; Vetter GMBH, Wiesloch; Photoapparat: Quicks-hooter™, Modell QSP, IBI, New Haven).

2.16.5 Primer und Sequenzen

Bezeichnung des Primers	Gen- produkt	Produkt- länge	Primersequenz [5' nach 3']
GA (1) GA (2)	GAPDH	360 bp	CCAGCCGAGCCACATCGCTC ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
hBD-2 (1) hBD-2 (2)	hBD-2	255 bp	CCAGCCATCAGCCATGAGGGT GGAGCCCTTTCTGAATCCGCA
IL-8 (1) IL-8 (2)	IL-8	951 bp	CTTTCAGAGACAGCAGAGCAC ACTGTGAGGTAAGATGGTGGC

Tabelle 2-3: Verwendete Primer

3 Ergebnisse

3.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält verschiedene LILAs

Ausgehend von den Ergebnissen der vorausgegangenen Arbeiten (Kahlke, 1993; Bülow, 1997) wurde für die Präparation von LILA die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Quelle gewählt.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten in verschiedenen, unabhängigen Präparationen leukozytenaktivierende Substanzen nachgewiesen werden. Ein erster Reinigungsschritt der Lipidextrakte bestand aus der Trennung der Lipide nach ihrer Löslichkeit: Lipide, die sich in einem pH 8 Puffersystem lösen, Lipide, die sich in einem pH 13 Puffersystem lösen und Lipide, die sich in beiden Puffersystemen nicht lösen wurden getrennt aufbereitet und auf ihre Fähigkeit überprüft, die Degranulation der Inhalte azurophiler Granula neutrophiler Granulozyten zu stimulieren. Die pH 8-löslichen und pH 13-unlöslichen Anteile des Lipidextraktes enthielten keine leukozytenaktivierenden Fraktionen (nicht abgebildet). LILA-Aktivität war ausschließlich im pH 13-löslichen Anteil des Lipidextraktes nachweisbar. Dadurch wurden lipidartige Verunreinigungen, die keine LILA-Aktivität aufwiesen, abgetrennt. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden aus diesem Grunde nur die pH 13-löslichen Anteile der Lipidextrakte aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.

Um zu untersuchen, ob sich die biologisch aktiven Lipide ausschließlich in den Zellfragmenten oder in den löslichen Anteilen der Hefezellen befinden, wurden die nach der Homogenisation (2.5, Seite 17) erhaltenen Zellfragmente getrennt von den löslichen Anteilen aufbereitet. Aus beiden Anteilen ließen sich pH 13-löslichen Lipide extrahieren, die anschließend an einer Umkehrphasen HPLC-Säule (System I, Tabelle 2-1) aufgetrennt wurden. Die einzelnen HPLC-Fraktionen wurden auf ihre Fähigkeit überprüft, die Freisetzung der Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten zu stimulieren. Die Überprüfung ergab, dass sowohl die löslichen Anteile der Hefezellen als auch die Zellfragmente lipidartige Leukozytenaktivatoren enthalten. Für weitere Präparationen wurden deshalb ausschließlich Gesamtextrakte aus Zellfragmenten und löslichen Anteilen verwendet.

Die chromatographische Trennung der pH 13-löslichen Lipidphase ergab, dass *Saccharomyces cerevisiae* mindestens sechs, in dem verwendeten HPLC-System (System I Tabelle 2-1, Seite 19) trennbare LILAs enthält (Abbildung 3-1). Das in Abbildung 3-1 dargestellte Chromatogramm zeigt eine repräsentative Trennung von pH 13-löslichen Lipiden aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die biologische Aktivität fiel nach dem ersten Chromatographieschritt nicht mit einem klar definierbaren UV-Peak ($\lambda = 203 \text{ nm}$) zusammen. Als Identifikationsmerkmal diente ausschließlich die biologische Aktivität (die Fähigkeit, in neutrophilen Granulozyten die Freisetzung von Myeloperoxidase auszulösen).

Bezeichnung	Retentionszeit im HPLC- System I [min]	Retentionszeit im HPLC- System II [min]	Chromatogramme (Abbildungsnummer, Seite)
LILA-1	32	15-18	Abbildung 3-2, Seite 31
LILA-2	32	24	Abbildung 3-2, Seite 31
LILA-3	21	23-24	Abbildung 3-42, Seite 69
LILA-4	25	21	Abbildung 3-43, Seite 70
LILA-5	28	9	Abbildung 3-44, Seite 70
LILA-6	35	13	Abbildung 3-45, Seite 71
LILA-7	35	23	Abbildung 3-45, Seite 71
LILA-8	37	39	Abbildung 3-46, Seite 71

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierten lipi-dartigen Leukozytenaktivatoren (LILAs).

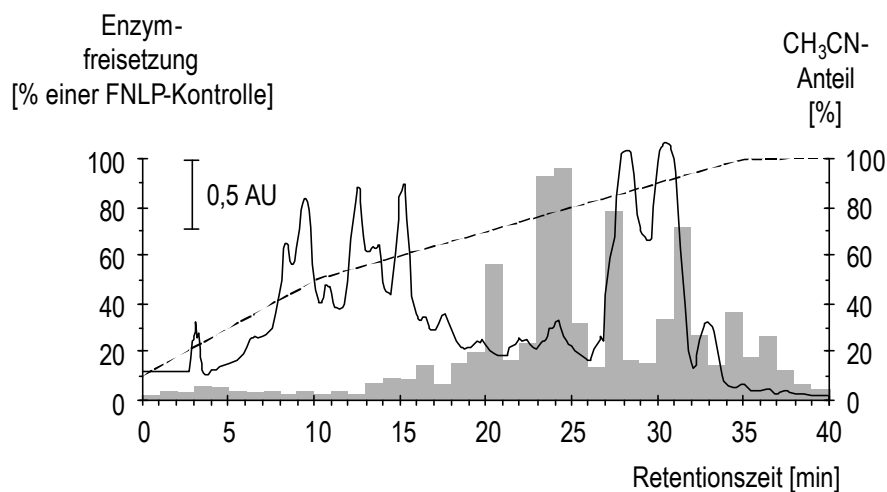


Abbildung 3-1: Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält verschiedene LILAs. Lipidextrakte wurden chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C_8 -Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μ l jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH_3CN -Anteil im Laufmittel (----). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLN normiert (= 100%). Die Aktivitätsspeaks bei 21, 25, 28, 32; 35 und 37 min entsprechen den in Tabelle 3-1 aufgelisteten LILAs. In diesem HPLC-System koeluiieren LILA-1 und LILA-2 bei einer Retentionszeit von 32 min, sowie LILA-6 und LILA-7 bei einer Retentionszeit von 35 min.

3.2 LILA-1 und LILA-2: zwei exogene Chemotaxine mit struktureller Ähnlichkeit

Die weitere Aufreinigung der LILA-Fraktion, die im ersten HPLC-System eine Retentionszeit von 32 min zeigte, führte zu zwei chromatographisch unterscheidbaren Leukozytenaktivatoren: LILA-1 und LILA-2 (Abbildung 3-2). Um den Einfluss von Verunreinigungen auf die Charakterisierungsexperimente zu verringern, wurden von LILA-1 ausschließlich zweifach chromatographierte (HPLC-System I und II) Präparationen verwendet.

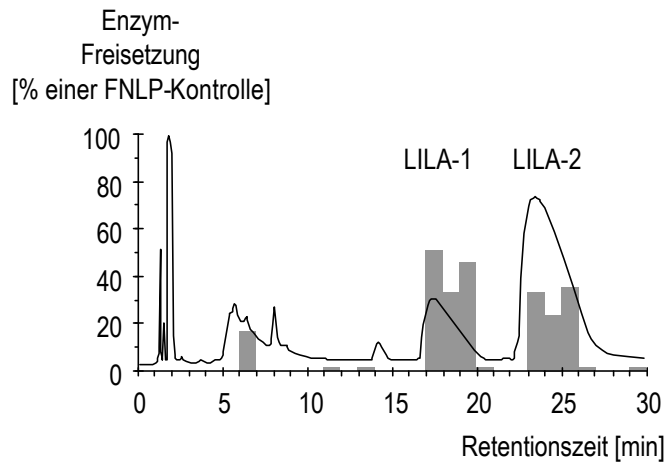


Abbildung 3-2: LILA-1 und LILA-2 sind in einem zweiten HPLC-Schritt voneinander trennbar. Fraktionen aus dem ersten HPLC-Schritt, die Leukozytenaktivatoren enthielten, wurden in einem zweiten HPLC-Schritt weitergereinigt (Umkehrphasen-HPLC, C_{18} -Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 2 ml/min, HPLC-System II, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μ l jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%). Die Aktivitätspeaks bei 19 und 25 min entsprechen den in Tabelle 2-1 aufgelisteten LILA-1 und LILA-2, die im ersten HPLC-System bei 32 min koeluieren (Abbildung 3-1).

3.2.1 LILA ist weder ein Lysophosphatidylcholin noch ein Phospholipid

In einem weiteren Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob es sich bei LILA um Lysophosphatidylcholine oder andere Phospholipide handelt. Ergebnisse vorausgegangener Arbeiten hatten gezeigt, dass LILA-Präparationen 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin enthalten (Bülow, 1997). Mit Hilfe von Phospholipasen sollte überprüft werden, ob die LILA-Aktivität von Lysophosphatidylcholinen oder anderen Phospholipiden herrührt.

Dazu wurden vorgereinigte LILA Präparationen in unterschiedlichen Konzentrationen mit Phospholipasen inkubiert. Zum Einsatz kam hierbei eine HPLC-Fraktion eines pH13-Lipidextraktes (Abbildung 3-3) und eine HPLC-Fraktion eines vorgereinigten pH13-Lipidextraktes (Abbildung 3-4).

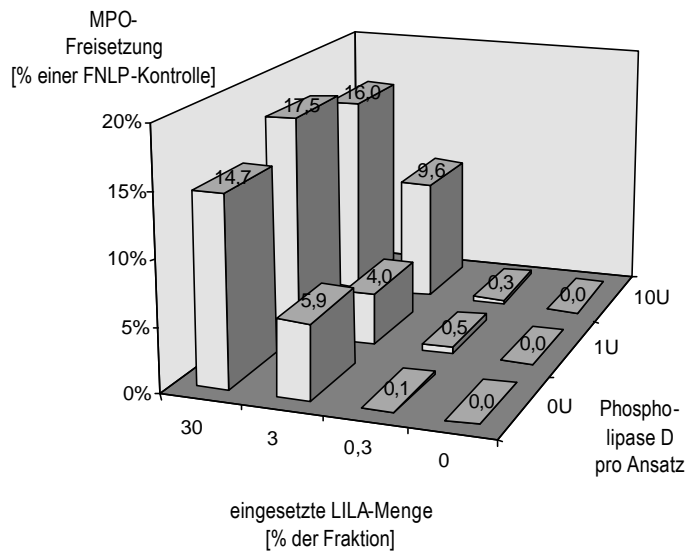


Abbildung 3-3: Ein Gemisch aus LILA-1 und LILA-2 wird durch Phospholipase D nicht inaktiviert. Eine HPLC-Fraktion, die LILA-1 und LILA-2 enthielt, wurde mit Phospholipase D Typ IV inkubiert, anschließend extrahiert und in einem Enzymfreisetzungstest mit 10^6 PMN inkubiert. Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%).

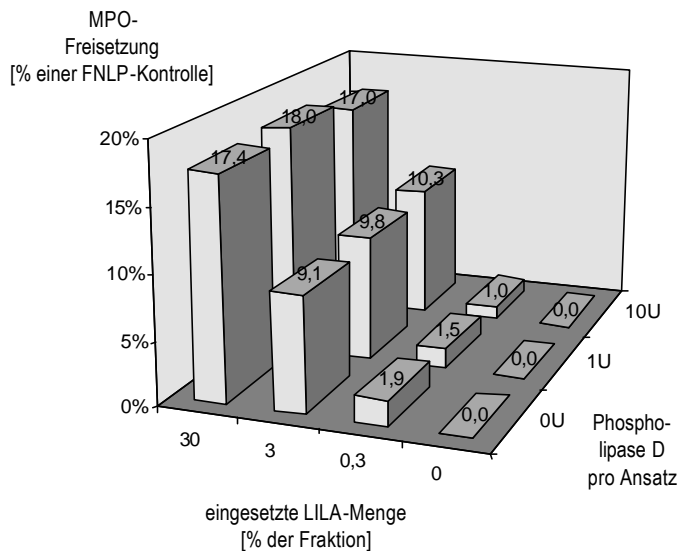


Abbildung 3-4: LILA-1 wird durch Phospholipase D nicht inaktiviert. Eine weitergereinigte HPLC-Fraktion, die LILA-1 enthielt, wurde mit Phospholipase D Typ IV inkubiert, anschließend extrahiert und in einem Enzymfreisetzungstest mit 10^6 PMN inkubiert. Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%).

Wie in Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4 dargestellt, konnte bei keiner LILA-Konzentration eine Verringerung des LILA-Signals durch steigende Phospholipasekonzentrationen erreicht werden. Phospholipasen sind hochaktive Enzyme, die bereits in der oben eingesetzten Konzentration von 1 U/Versuchsansatz alle enthaltenen Phospholipide und Phosphocholine hydrolysieren sollten (Unit-Definition: 1 U Phospholipase D VI löst bei 30°C und pH 5,6 1 µmol Cholin von L-α Phosphatidylcholin pro Stunde ab). Das LILA-Signal konnte auch bei einem Enzymüberschuss von 10 U/Versuchsansatz nicht deaktiviert werden. Effekte die durch Substratüberschuss hervorgerufen werden, und zu unvollständiger Umsetzung führen, konnten somit ausgeschlossen werden.

Die in Abbildung 3-5 dargestellten Chromatogramme zeigen, dass sich die Lipidzusammensetzung durch Inkubation mit Phospholipase C (Abbildung B) und Phospholipase D (Abbildung C) gegenüber der Kontrolle (Abbildung A) verändert. Die LILA-Signale (Peaks in den Bereichen 30' und 34') blieben durch die Phospholipasen unverändert. Somit scheint die LILA-Aktivität weder von Phosphocholinen noch von anderen Phospholipiden zu stammen.

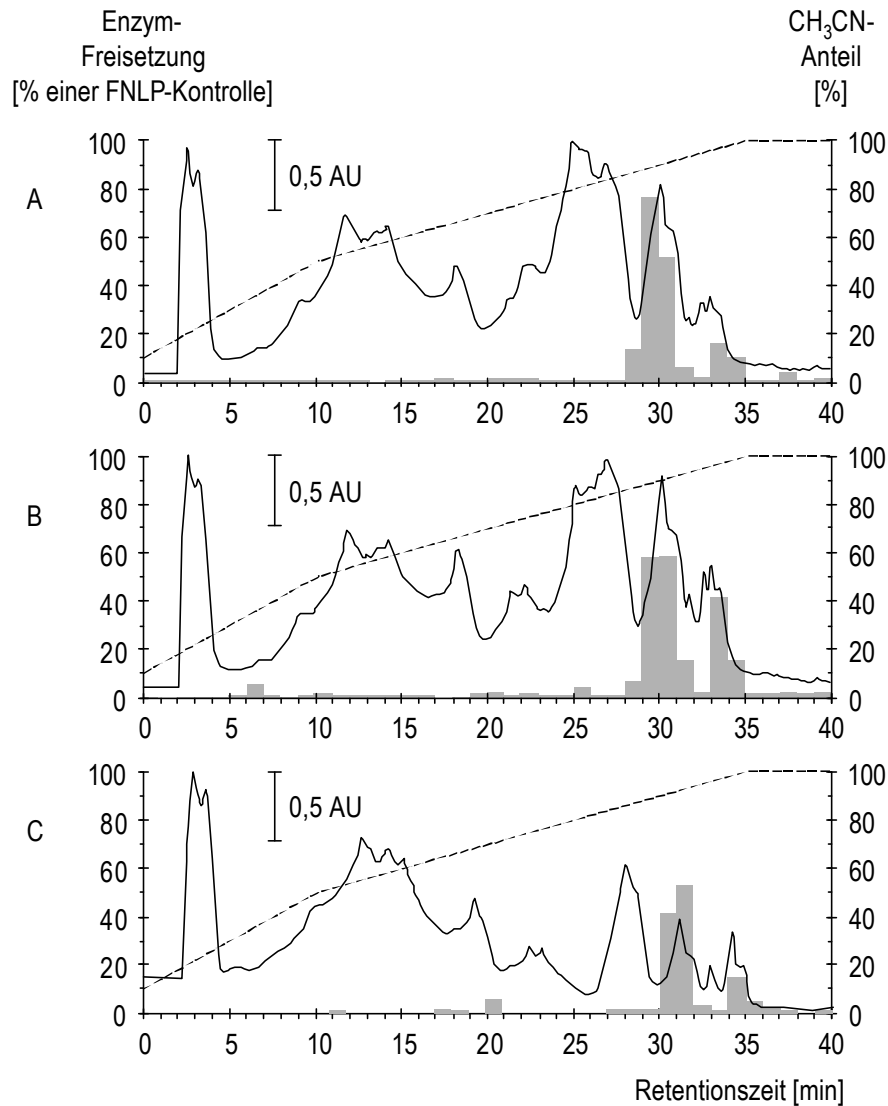


Abbildung 3-5: Phospholipasen beeinflussen die LILA-Aktivität nicht. Ein pH 13-lösliches Lipidextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in drei Teile geteilt und die Aliquots A) mit Puffer (Kontrolle) B) mit Phospholipase C und C) mit Phospholipase D Typ VI behandelt, anschließend chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C_8 -Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μ l jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH_3CN -Anteil im Laufmittel (----). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%). Die Aktivitätsspeaks bei 32 und 35 min bleiben trotz Phospholipasenbehandlung bestehen.

Um Lysophosphatidylcholine effektiv aus den LILA-Präparationen abzutrennen, wurden pH 13-lösliche Lipidextrakte mit Phospholipase C vorbehandelt, und anschließend über die HPLC-Systeme I und II (Tabelle 2-1, Seite 19) weitergereinigt. Abbildung 3-6 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm einer solchen Reinigung. LILA enthaltende Fraktionen wurden einer massenspektrometrischen und $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchung unterzogen (3.2.2 und 3.2.3).

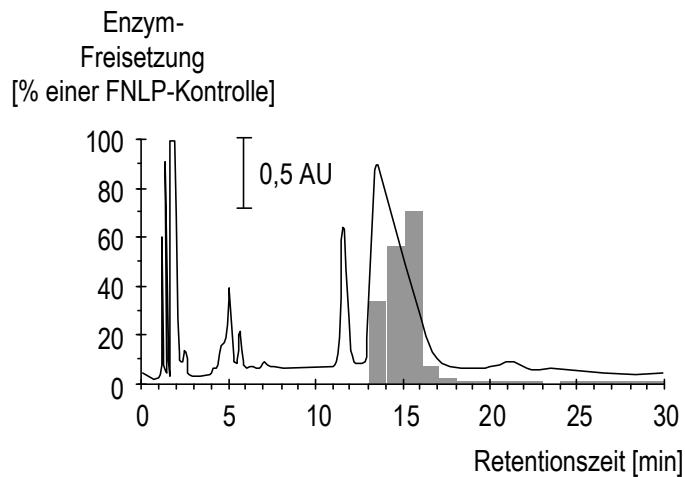


Abbildung 3-6: Eine Vorbehandlung von LILA-Präparationen mit Phospholipasen führt zur Abtrennung von Phospholipiden und Phosphatidylcholinen. HPLC-Fractionen, die LILA-1 enthielten wurden mit Phospholipase C behandelt, anschließend über ein zweites Umkehrphasen-HPLC-System (C_{18} -Säule, isokratisch) weitergereinigt) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 2 ml/min, HPLC-System II, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μl jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203 \text{ nm}$ und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%).

3.2.2 LILA-1 enthält Palmitoleinsäure in gebundener Form

Um Informationen über die LILA-Struktur zu erhalten, wurden gereinigte LILA-1 Proben hydrolysiert und die entstandenen Produkte mittels GC/MS analysiert. Dabei konnte ein Hydrolyseprodukt mit einem M^+ -Peak bei $m/z = 254$ nachgewiesen werden (Abbildung 3-7). Da das Massenspektrum mit Spektren von einfach ungesättigten Fettsäuren übereinstimmt, könnte LILA Palmitoleinsäure oder Palmitelaidinsäure, die beide die Summenformel $C_{16}H_{30}O_2$ zeigen, enthalten.

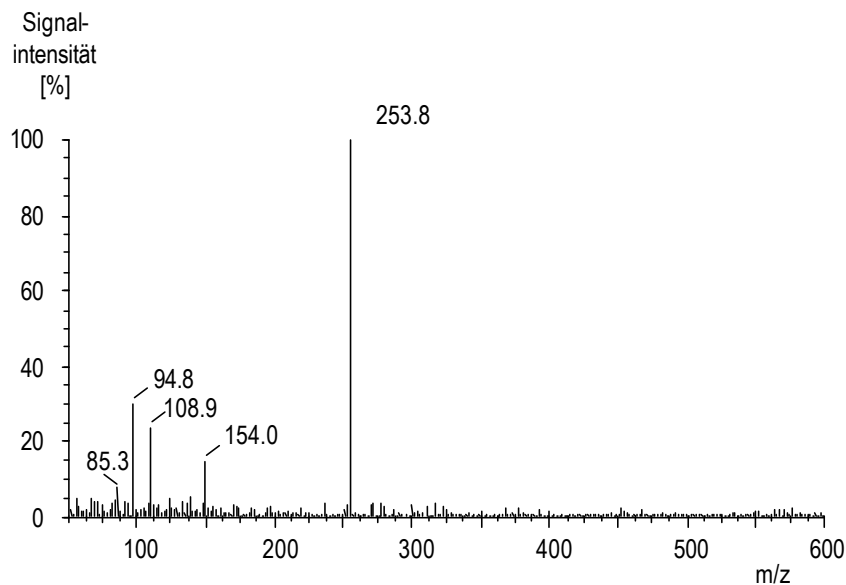


Abbildung 3-7: Gaschromatographie-Massenspektrum einer hydrolysierten LILA-1 Probe aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Eine 1H -NMR Untersuchung einer LILA-1 Probe zeigte charakteristische Signale, die mit Signalen einer Fettsäure mit einer Doppelbindung übereinstimmen. Protonen aus weiteren Gruppen, insbesondere von Cholin-Resten, konnten nicht nachgewiesen werden. Abbildung 3-8 zeigt ein zweidimensionales, Abbildung 3-9 den Ausschnitt eines eindimensionalen 1H -NMR-Spektrums einer LILA-1 Probe. In Tabelle 3-2 ist die Auswertung der Signale zusammengestellt und in Abbildung 3-10 ist die Zuordnung der Signale zu einzelnen Protonen mit zugehörigem Strukturvorschlag dargestellt.

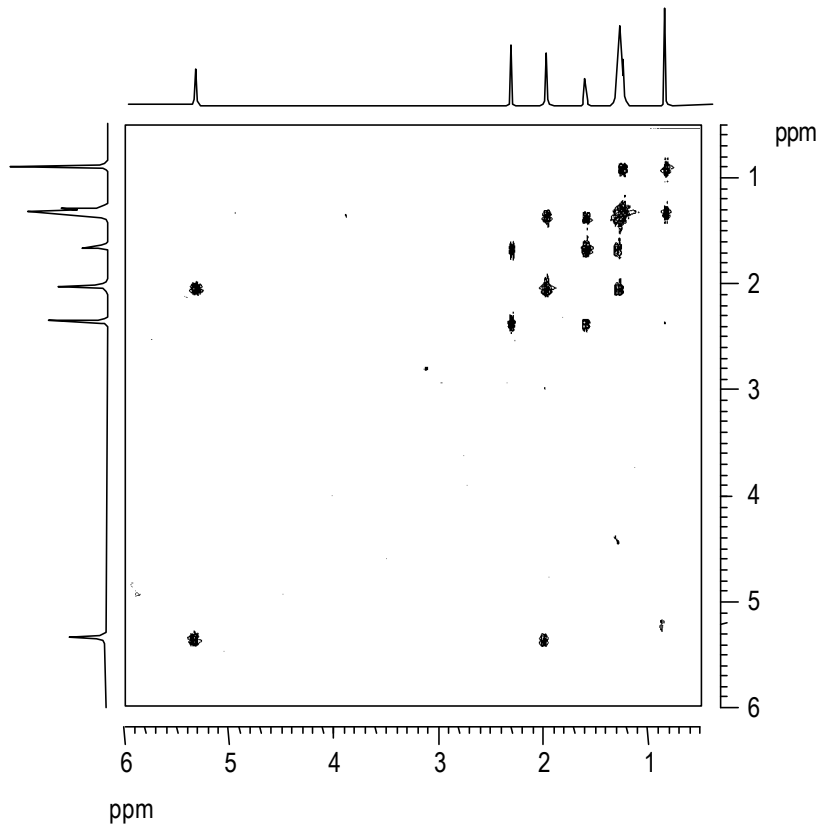


Abbildung 3-8: 2D-¹H-NMR (Cosy)-Spektrum einer LILA-1 Probe. Lösungsmittel: CDCl₃

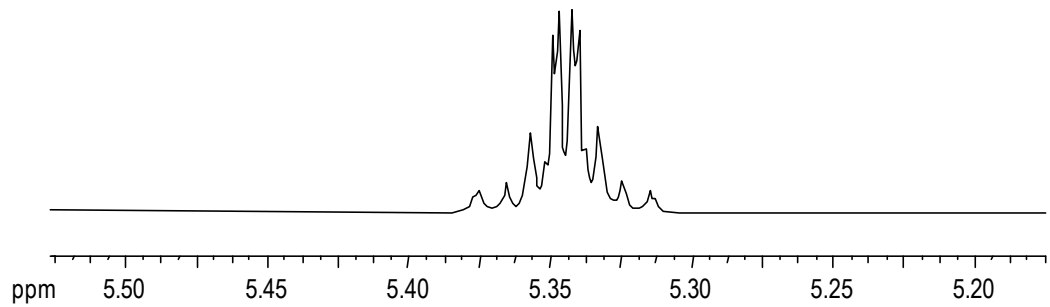


Abbildung 3-9: Ausschnitt eines ¹H-NMR-Spektrums einer LILA-1 Probe (Signale der Doppelbindungsprotonen). Lösungsmittel: CDCl₃

Signal [ppm]	Anzahl	Integral	Gekoppelt an [ppm]
5,35	Symmetrisches Multiplet	2	2,01
0,88	Triplet	2	1,64
2,35	Quartett	4	5,35; 1,32
2,01	Quartett	2	2,35; 1,33
1,64	Asymmetrisches Multiplet	16	2,01; 1,64; 0,88
1,30	Triplet	3	1,29

Tabelle 3-2: Kombination und Auswertung der in Abbildung 3-9 und Abbildung 3-8 dargestellten 1D beziehungsweise 2D (Cosy) NMR-Spektren einer LILA-1 Probe.

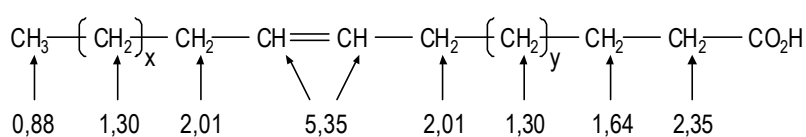


Abbildung 3-10: Zuordnung der Signale aus Tabelle 3-2 zu Protonen innerhalb einer Struktur. Hier eine C_{16} -Fettsäure mit einer Doppelbindung ($X+Y = 8$).

3.2.3 LILA-2 enthält Linolsäure in gebundener Form

Neben LILA-1 konnten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* noch weitere lipidartige Leukozytenaktivatoren nachgewiesen werden. LILA-2 koeluiert im ersten HPLC-System mit LILA-1 (Abbildung 3-1) und konnte in einem zweiten HPLC-Schritt von LILA-1 getrennt werden (Abbildung 3-2). Die chemischen und biologischen Eigenschaften von LILA-2 stimmen weitestgehend mit denen von LILA-1 überein: LILA-2 ist pH 13-löslich, nicht flüchtig (bei 50°C/1000 mbar; 25°C/50 mbar; -80°C/0,02 mbar) induziert die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (Abbildung 3-2), ist durch Phospholipasen nicht deaktivierbar (Abbildung 3-3) und somit ebenfalls weder ein Phospholipid noch ein Phosphocholin. Zur chemischen Charakterisierung wurden LILA-2 Präparationen parallel zu LILA-1 Präparationen zunächst mit Hilfe massenspektrometrischer und ^1H -kernspinresonanzspektroskopischer Methoden untersucht.

Die ^1H -kernspinresonanzspektroskopische Messung einer LILA-2 Probe ergab ebenfalls keine charakteristischen Lysophosphatidylcholin-Signale. Die aufgenommenen Spektren (Abbildung 3-11 und Abbildung 3-12) zeigen Ähnlichkeiten zur LILA-1 Probe und deuten auf eine reine Komponente hin. Die gemessenen Signale decken sich mit denen einer Fettsäure mit zwei Doppelbindungen und einer allylischen Methylengruppe in Nachbarschaft zu beiden Doppelbindungen. GC/MS-Analysen einer hydrolysierten LILA-2 Probe führten zu Linolsäure, was mit ^1H -NMR-Daten in guter Übereinstimmung ist. In Tabelle 3-3 ist die Auswertung der Signale zusammengestellt und in Abbildung 3-13 ist die Zuordnung der Signale zu einzelnen Protonen mit zugehörigem Strukturvorschlag dargestellt.

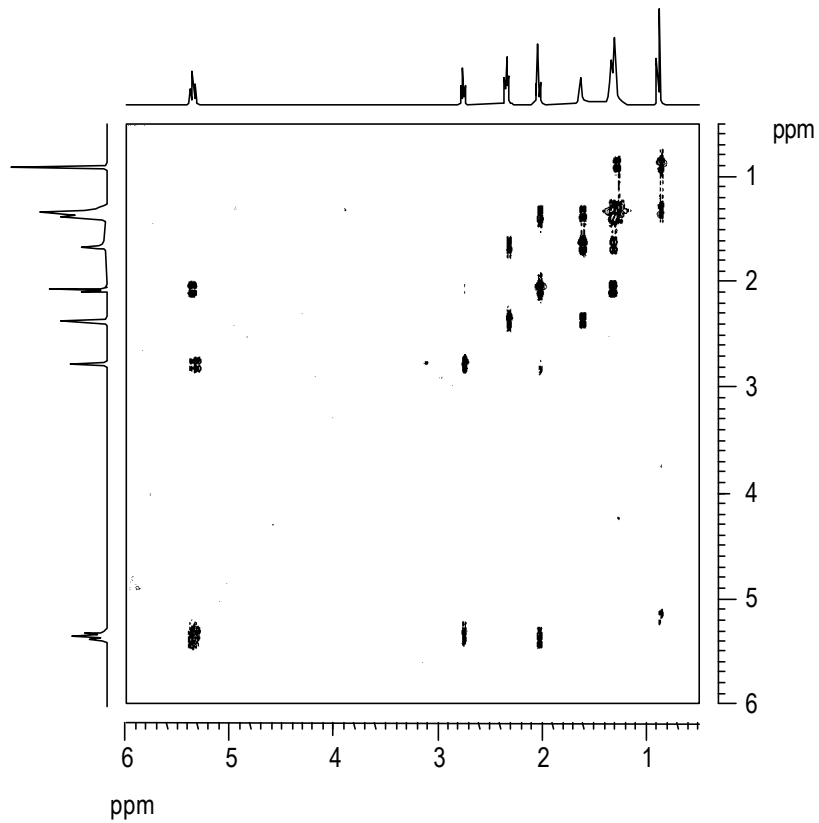


Abbildung 3-11: $2\text{D-}^1\text{H-NMR}$ (Cosy)-Spektrum einer LILA-2 Probe. Lösungsmittel: CDCl_3

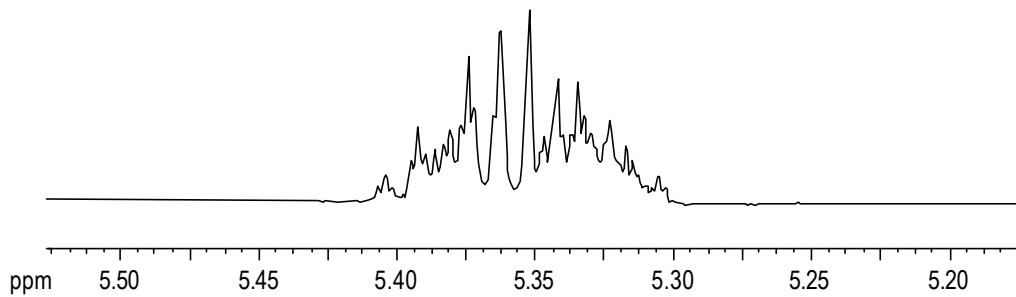


Abbildung 3-12: Teilausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums einer LILA-2 Probe (Signale der Doppelbindungsprotonen). Lösungsmittel: CDCl_3

Signal [ppm]	Anzahl	Integral	Gekoppelt an [ppm]
5,35	Asymmetrisches Multiplet	4	2,77; 2,77*; 2,05
2,77	Triplet	2	5,37*; 5,32; 2,05*
2,35	Triplet	2	1,64
2,05	Quartett	4	5,37; 2,77*; 1,35
1,65	Quintett	2	2,35; 1,34
1,33	Asymmetrisches Multiplet	14	2,05; 1,64; 0,89
0,89	Triplet	3	1,31

Tabelle 3-3: Kombination und Auswertung der in Abbildung 3-9 und Abbildung 3-8 dargestellten 1D beziehungsweise 2D (Cosy) $^1\text{H-NMR}$ -Spektren einer LILA-2 Probe (* = Kopplung über einen breiten Bereich).

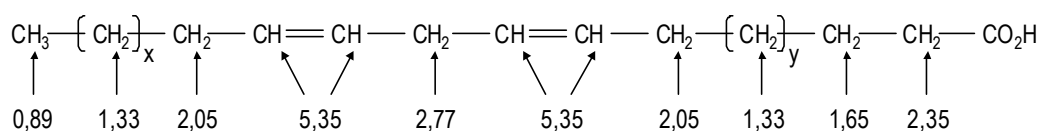


Abbildung 3-13: Zuordnung der Signale aus Tabelle 3-3 zu Protonen innerhalb einer Struktur. Hier eine C_{18} -Fettsäure mit zwei Doppelbindungen ($X+Y = 7$).

3.2.4 LILA-1 und LILA-2 besitzen ein gemeinsames strukturelles Motiv

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden an LILA-1 -und LILA-2-Präparationen parallel durchgeführt, um eventuell vorhandene strukturelle Verwandtschaften besser erkennen zu können. Abbildung 3-14 zeigt eine im Electron-Impact-Modus durchgeführte Messung einer LILA-1-Probe mit prominenten Signalen bei $m/z = 293$ und $m/z = 547$.

Das in Abbildung 3-15 dargestellte Massenspektrum von LILA-1, zeigt eine im Electrospray-Ionisationsmodus durchgeführte Messung mit Signalen, die auch in einer Electron-Impact-Messung einer identischen Probe nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3-14). Die im Vergleich zum Electron-Impact schonendere Methode führte zu zwei Molekülionpeaks bei $m/z = 533$ und $m/z = 547$, sowie manchmal auch $m/z = 563$.

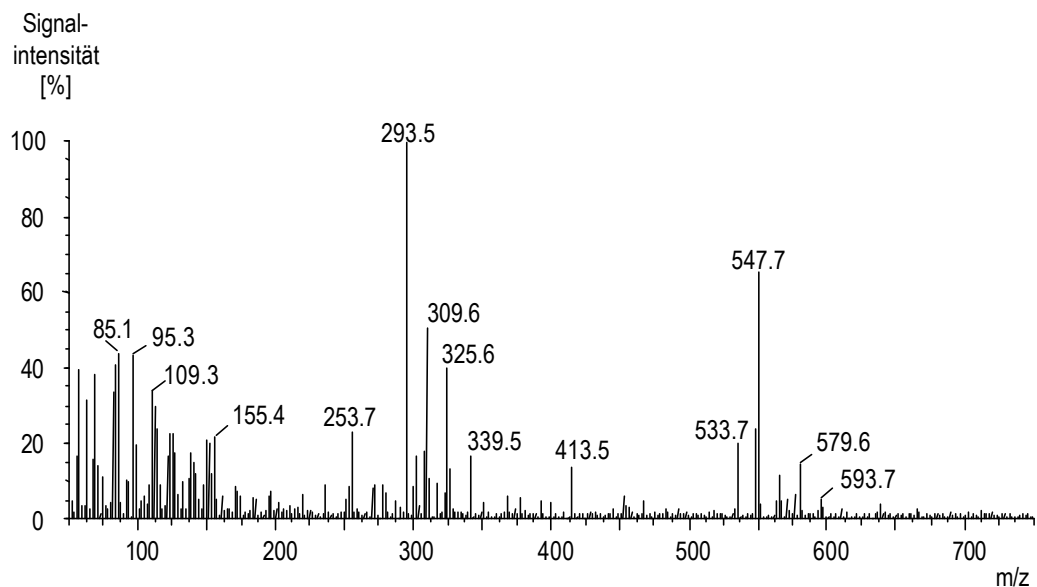


Abbildung 3-14: Electron Impact Spektrum einer LILA-1 Probe. Die zuvor mit Phospholipase D behandelten Proben waren in $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ gelöst und anschließend massenspektrometrisch analysiert worden (Probentemperatur bis 180°C).

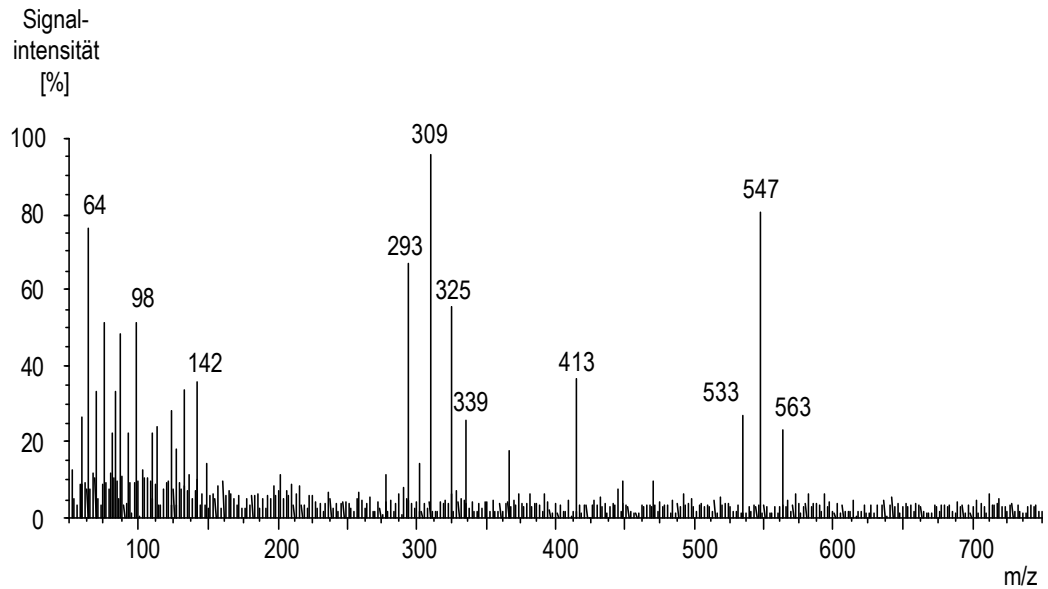


Abbildung 3-15: Massenspektrum einer im Elektrospray-Ionisations-Modus gemessene LILA-1 Probe. Die Probe war zuvor über zwei Umkehrphasen-HPLC-Schritte gereinigt und anschließend in CHCl_3 /Methanol gemessen worden (Cone-Voltage 35 V).

LILA-2 Präparationen, die massenspektrometrisch mit Hilfe der Elektrospray-Ionisation analysiert worden waren, zeigten Signale bei $m/z = 599$ und 585 (Abbildung 3-16), die zwei Molekülen zugeordnet werden konnten. Daneben wurden Signale von Fragmentationen bei 413 ; 365 ; 351 ; 335 ; 319 ; 301 und 279 gemessen.

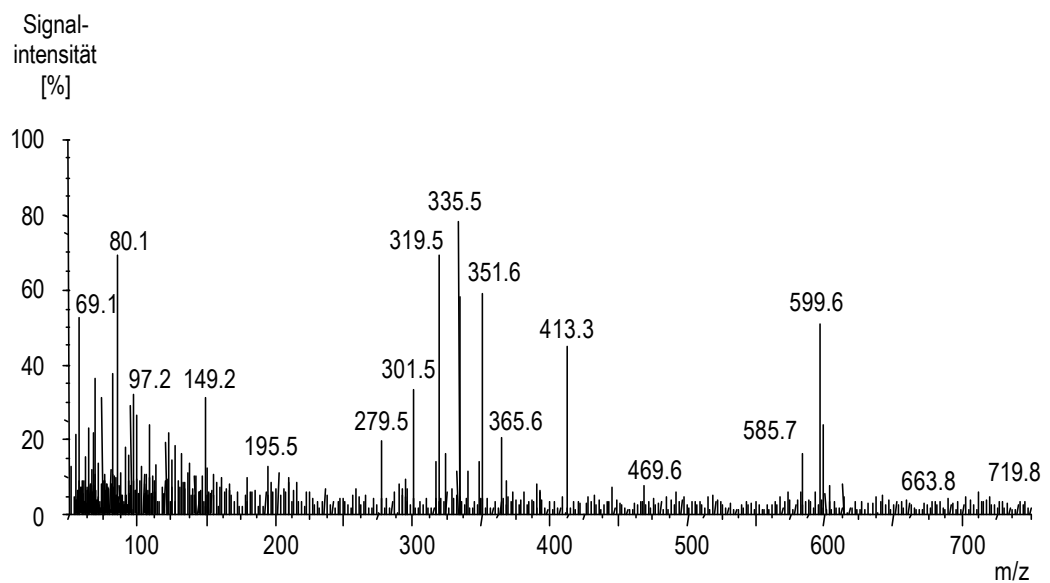


Abbildung 3-16: Electrospray Massenspektrum einer LILA-2 Probe (Cone-Voltage 35 V). Die Probe war zuvor über zwei Umkehrphasen-HPLC-Schritte gereinigt und anschließend in CHCl_3 /Methanol gelöst worden.

Durch Erhöhen der Beschleunigungsspannung innerhalb der Blende (Cone-Voltage) von 35 V (Standard, wenn nicht anders angegeben) auf 60 V konnte eine Veränderung der Signalintensitäten zugunsten des Fragmentes bei $m/z = 319$ erreicht werden.

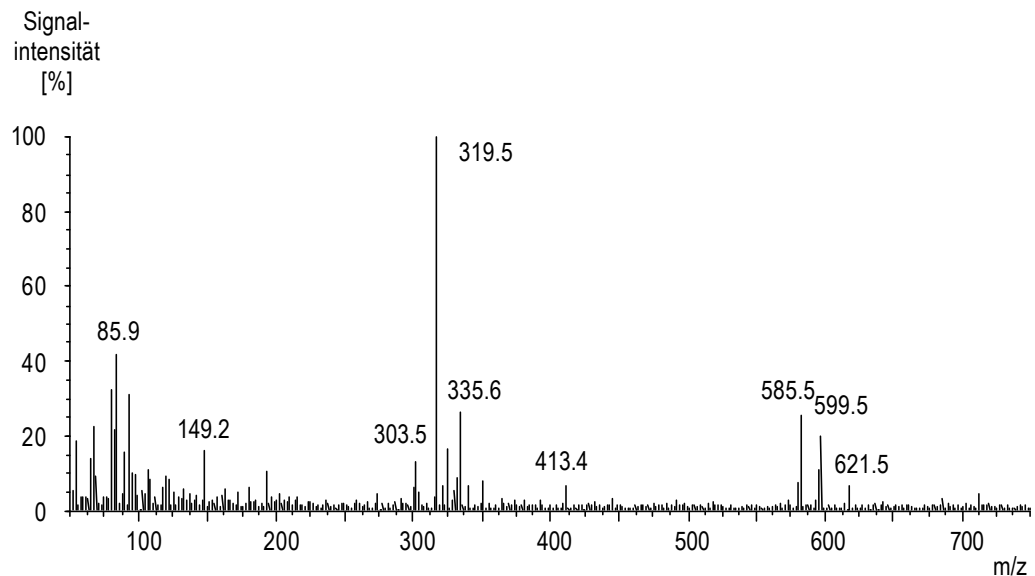


Abbildung 3-17: Electrospray Massenspektrum einer LILA-2 Probe, identisch mit der Probe in Abbildung 3-16 (Cone-Voltage 60 V). Die Probe war zuvor über zwei Umkehrphasen-HPLC-Schritte gereinigt worden und anschließend in $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ gemessen worden.

Die vermeintlichen Molekülionpeaks von LILA-1 ($m/z = 533$ und $m/z = 547$) weisen gegenüber den vermeintlichen Molekülionsignalen von LILA-2 ($m/z = 585$ und $m/z = 599$) eine Massedifferenz von 52 Einheiten auf. Dies entspricht genau der doppelten Massendifferenz der beiden identifizierten Fettsäuren ($280 - 254 = 26$, $2 \times 26 = 52$).

3.3 Die Inkubation von Harnstoff mit Säurechloriden liefert Substanzen, die LILA-1 aus *Saccharomyces cerevisiae* gleichen.

Die Daten der $^1\text{H-NMR}$ Untersuchungen sprechen dafür, dass LILA neben den in der Fettsäure enthaltenen Protonen keine weiteren an Kohlenstoff gebundenen Protonen enthält. Aus diesem Grunde wurde vermutet, dass neben zwei Fettsäureresten eine Kerngruppe mit der postulierten Elementarzusammensetzung $\text{CH}_2\text{N}_2\text{O}$ (mit aziden Protonen am Stickstoff), die Harnstoff entsprechen könnte, enthalten ist. Deshalb wurde Harnstoff mit Palmitoleinsäurechlorid acyliert und die entstandenen Syntheseprodukte analysiert.

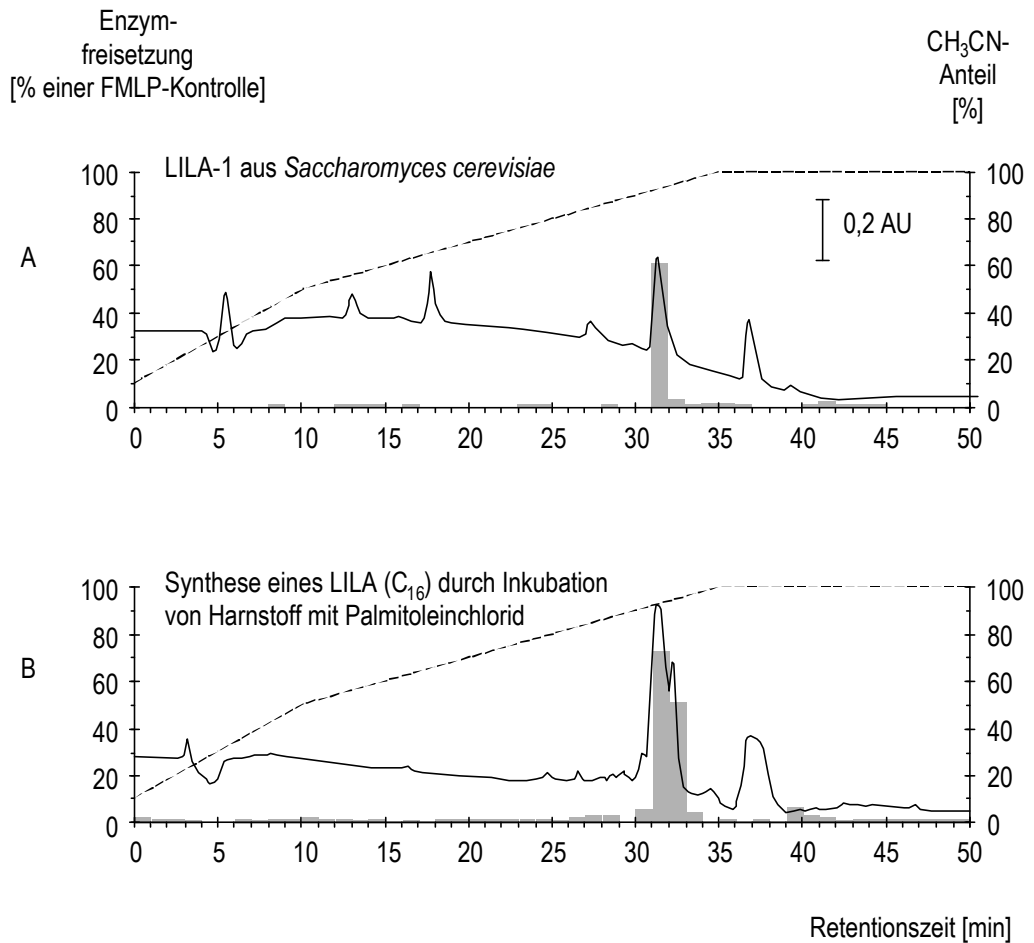


Abbildung 3-18: LILA-1 und ein synthetischer Bis-palmitoleoyl-harnstoff sind chemisch und biologisch identisch. Chromatogramm A) zeigt eine rechromatographierte LILA-1 Probe und Chromatogramm B) das Ergebnis einer Acylierung von Harnstoff mit Palmitoleinsäurechlorid. Die Proben wurden chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C₈-Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 µl jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10⁶ Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3).

Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203 \text{ nm}$, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH₃CN-Anteil im Laufmittel (----). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10⁻⁷ M FMLP normiert (= 100%).

Eine Überprüfung des synthetischen Bis-palmitoleoyl-harnstoff ergab, dass dieser ebenfalls die Freisetzung der Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten stimuliert und mit natürlichem LILA-1 im HPLC-System I (Abbildung 3-18) und HPLC-System II koeluiert. Damit handelt es sich bei LILA-1 um Bis-palmitoleoyl-harnstoff. Ein analoges Experiment mit der Synthese eines synthetischen Bis-acyl-harnstoffes mit Linolsäure als Rest führte zu vergleichbaren Ergebnissen: Bis-linolyyl-harnstoff koeluiert mit LILA-2 in zwei HPLC-Systemen (System I und II) und stimuliert die Enzymfreisetzung in neutrophilen Granulozyten.

Substanz	HPLC-System I Retentionszeit [min]	HPLC-System II Retentionszeit [min]
LILA-1 (aus <i>Saccharomyces</i>)	32	18-20
Bis-acyl-harnstoff R = C _{16:1}	32	~18
LILA-2 (aus <i>Saccharomyces</i>)	32	24-26
Bis-acyl-harnstoff R = C _{18:2}	32	~24

Tabelle 3-4: Retentionszeiten der synthetischen LILA-Äquivalente im Vergleich zu LILA-1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Bei HPLC-System I und II handelt es sich um Umkehrphasen HPLC (C₈-Säule mit CH₃CN-Gradient bzw. C₁₈-Säule isokratisch), eine detaillierte Beschreibung der HPLC-Systeme ist in Tabelle 2-1 (Seite 19) aufgeführt.

Die biologisch aktiven Substanzen wiesen jeweils Retentionszeiten von 32 min auf. Die LILA-1 Probe aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigte in diesem Bereich einen klar definierten Peak (Abbildung 3-18 A), wobei die synthetische Probe im selben Bereich einen Doppelpack zeigte (Abbildung 3-18 B). Die biologische Aktivität koeluierte mit beiden UV-Peaks. Um zu überprüfen, welche der beiden synthetischen Fraktionen aus diesem Bereich mit natürlichem LILA koeluierten wurde ein Additionsexperiment durchgeführt (Abbildung 3-19). Aus dem Experiment ergab sich, dass der erste Teil des Doppelpacks mit dem natürlichen LILA koeluiert. Für weitere Experimente wurde ausschließlich diese Fraktion der Synthesen verwendet.

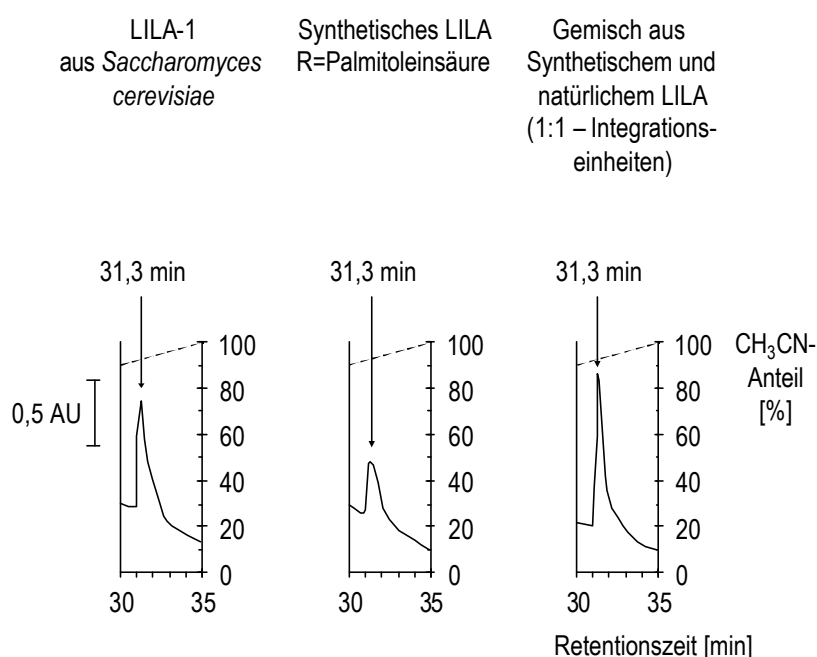


Abbildung 3-19: Additionsexperiment von natürlichem LILA aus *Saccharomyces cerevisiae* und synthetischem Bis-palmitoleoyl-harnstoff (HPLC-System I). Für die Addition wurde von LILA-1 und Bis-palmitoleoyl-harnstoff jeweils eine Menge eingesetzt, die 20 µg (bzw. $1,8 \times 10^7$ Integrationseinheiten) entspricht. Synthetischer Bis-palmitoleoyl-harnstoff und natürliches LILA koeluierten in diesem HPLC-System (Umkehrphasen-HPLC, C₈-Säule). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und der CH₃CN-Anteil (----) im Laufmittel.

3.4 Eichkurve zur Mengenbestimmung von Bis-acyl-harnstoffen

Voraussetzung für jegliche Mengen- und Konzentrationsangabe in den ausgewerteten Experimenten ist eine Methode zur Bestimmung sehr geringer Mengen. Hierzu wurden in mehreren Messungen verschiedene Aliquots einer zuvor ausgewogenen Menge Bis-palmitoleoyl-harnstoff mittels HPLC spektrometrischen Integrationseinheiten zugeordnet ($\lambda = 203 \text{ nm}$). Aus dem so ermittelten Quotient von Integrationseinheiten/ng wurde die in Abbildung 3-20 dargestellte Eichkurve erstellt. Chromatographisch getrennte Bis-acyl-harnstoffe können somit einer absoluten Menge zugeordnet werden. Da sich das Absorptionsverhalten bei 203 nm zwischen Bis-acyl-harnstoffen mit C16- und C18-Resten nicht unterscheidet, wurde die erstellte Eichkurve für die Mengenbestimmung beider Strukturen verwendet.

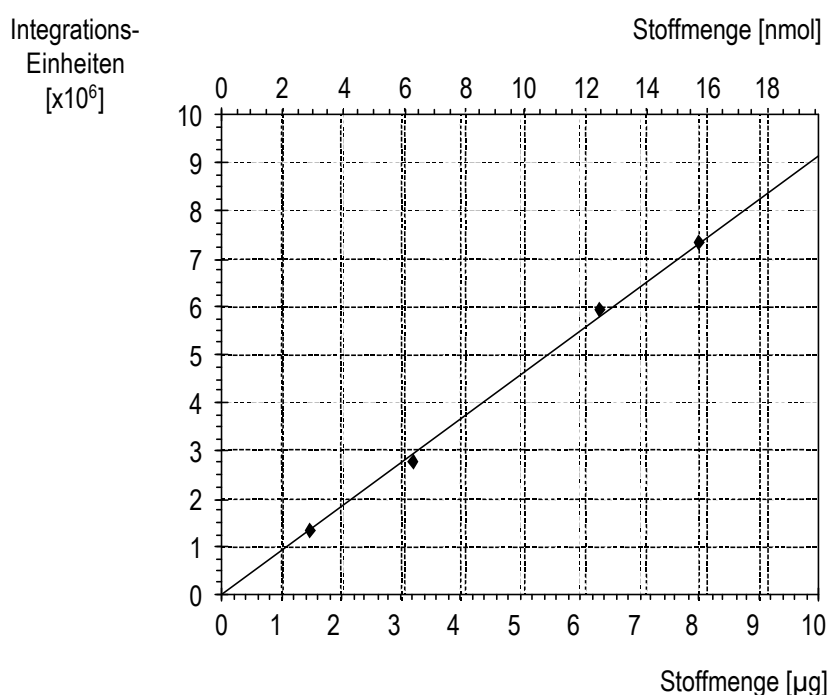


Abbildung 3-20: Eichkurve für Bis-palmitoleoyl-harnstoff ($MW = 532$) bei $\lambda = 203 \text{ nm}$; Range = 0,1; AT = 128.

3.5 Massenspektrometrische Untersuchungen an synthetischen Bis-acyl-harnstoffen

Synthetische Bis-acyl-harnstoffe wurden zunächst durch Extraktion der pH 8-löslichen Komponenten und einer anschließenden Umkehrphasen-HPLC von Verunreinigungen und Nebenprodukten der Synthese getrennt.

Als Ionisationsmethode wurde zunächst die Electron Impact Methode (Erhitzen) eingesetzt. Als Lösungsmittel zur Probenapplikation diente ein Methanol-Chloroform-Gemisch ($\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3 = 1 : 1$). Das in Abbildung 3-21 gezeigte Massenspektrum eines synthetischen Bis-palmitoleoyl-harnstoffes lieferte keinen eindeutigen Molekülionpeak, vermutlich aufgrund einer ausgeprägten Zersetzung. Das zu erwartende Molekülionssignal bei $m/z = 532$ fehlt vollständig. Die im Molekül gebundene Palmitoleinsäure ergab ein deutliches Fragmentensignal bei $m/z = 254$.

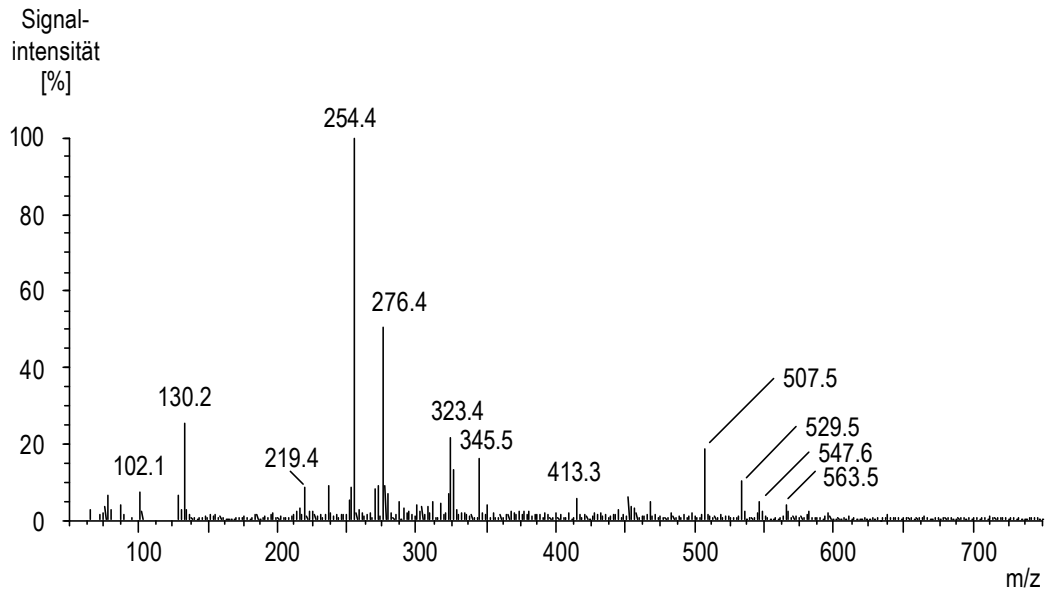


Abbildung 3-21: Electron Impact-Ionisation Massenspektrum einer synthetischen Bis-palmitoleoyl-harnstoff-präparation. Die Probe wurde nach der Synthese mittels einer Umkehrphasen-HPLC (C_8 -Säule, CH_3CN -Gradient) gereinigt, in $CHCl_3/CH_3OH$ aufgenommen und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Ein synthetischer Bis-linoly-l-harnstoff wurde ebenfalls mittels Electron Impact untersucht (Abbildung 3-22, Seite 47). Synthetischer Bis-linoly-l-harnstoff wurde zunächst über eine Extraktion der sauren Phase und anschließend über eine Umkehrphasen-HPLC von Verunreinigungen und Nebenprodukten der Synthese getrennt. Als Ionisationsmethode diente die Electron Impact-Methode (Erhitzen). Als Lösungsmittel zur Probenapplikation wurde ein Methanol-Chloroform-Gemisch ($CH_3OH : CHCl_3 = 1 : 1$) eingesetzt. Das in Abbildung 3-22 gezeigte Massenspektrum eines synthetischen Bis-acyl-harnstoffes ($R = \text{Linol}$) lieferte keinen eindeutigen Molekülionpeak, vermutlich aufgrund ausgeprägter Zersetzung. Das zu erwartende Molekülionssignal bei $m/z = 584$ fehlt vollständig. Ein Signal bei $m/z = 280$ rührt wahrscheinlich von freigesetzter Linolsäure her.

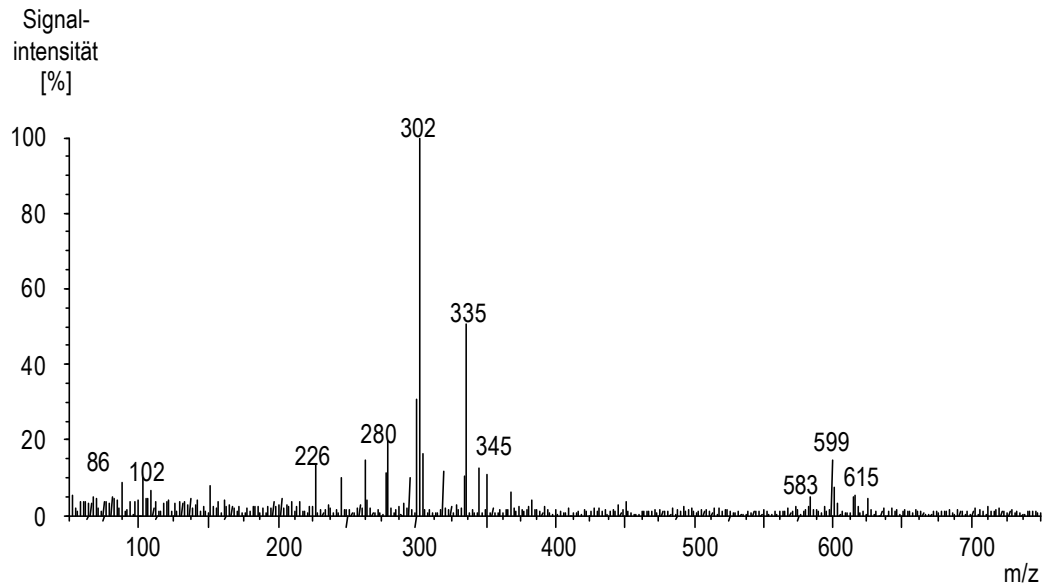


Abbildung 3-22: Electron Impact Massenspektrum eines Bis-linolyl-harnstoffes. Die Probe wurde nach der Synthese mittels Umkehrphasen-HPLC (C_8 -Säule, CH_3CN -Gradient) gereinigt, in $CHCl_3/CH_3OH$ aufgenommen und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

3.6 Elektrospray-Ionisations-massenspektrometrische Analysen natürlicher und synthetischer LILAs

In einem weiteren Versuchsansatz sollten massenspektrometrische Daten von natürlichem LILA und synthetischen, biologisch aktiven Bis-acyl-harnstoffen verglichen werden. Hierzu wurde gereinigtes LILA-2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und synthetischer Bis-linolyl-harnstoff mittels Elektrospray-Ionisation massenspektrometrisch untersucht. Das Massenspektrum zeigt Molekülionen bei $m/z=585$ und 599 , wobei die Intensitäten der einzelnen Signale bei LILA-2 und Bis-linolyl-harnstoff unterschiedlich waren.

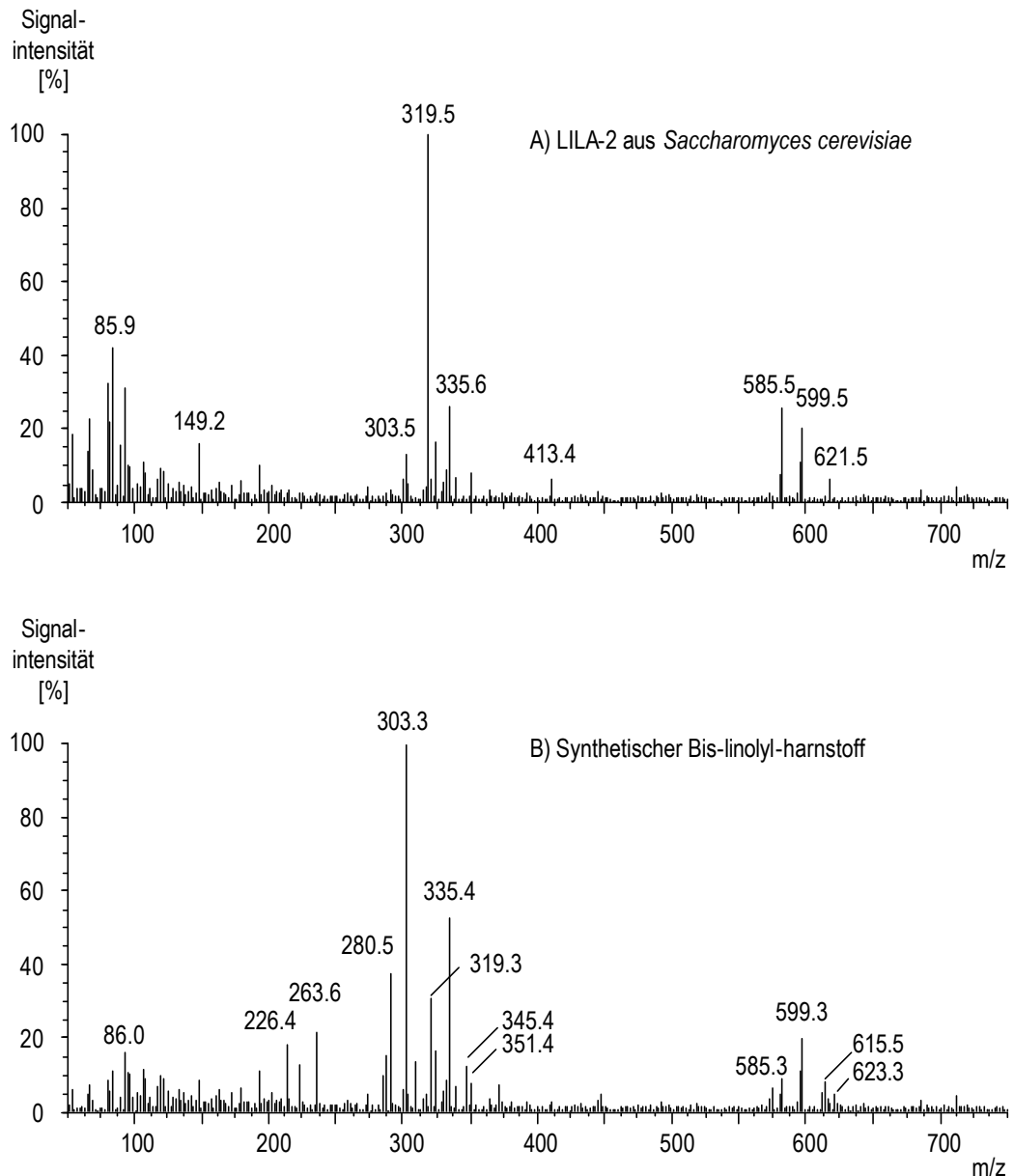


Abbildung 3-23: LILA-2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und Bis-linoyl-harnstoffe liefern massenspektrometrisch vergleichbare Massesignale.

A) Die LILA-2 Probe wurde über zwei Umkehrphasen-HPLC-Schritte (C_8 und C_{18} -Säule) chromatographisch gereinigt, in $CHCl_3/CH_3OH$ aufgenommen und anschließend mittels Electrospray Ionisation massenspektrometrisch analysiert.

B) Bis-linoyl-harnstoff wurde direkt nach der Synthese chromatographisch gereinigt (Umkehrphasen-HPLC C_8 -Säule), in $CHCl_3/CH_3OH$ aufgenommen und anschließend mittels Electrospray Ionisation massenspektrometrisch analysiert.

3.7 Natürliche LILAs und synthetische Bis-acyl-harnstoffe bilden die selben Abbauprodukte

Es wurde beobachtet, dass LILA chemisch nicht stabil zu sein scheint (Kahlke, 1989) und durch Behandlung mit Methanol inaktiviert wird (Kahlke, 1993). Daher bestand der Verdacht, dass LILA möglicherweise hydrolysiert wird. Chromatographische Trennungen von LILA-2, das über längere Zeit in einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Chloroform (1:1, v:v) gelagert worden war, ergab im HPLC-System I (Tabelle 2-1) Peaks mit einer Retentionszeit von 18 min und 36 min (Abbildung 3-24). Der Peak bei 18 min (Abbauprodukt A) ergab im Massenspektrum u.a. eine Masse bei $m/z = 295,5$ (Abbildung 3-25) das einem Linol-säuremethylester entsprechen könnte (kalkulierte Masse für $MH^+ = 295$).

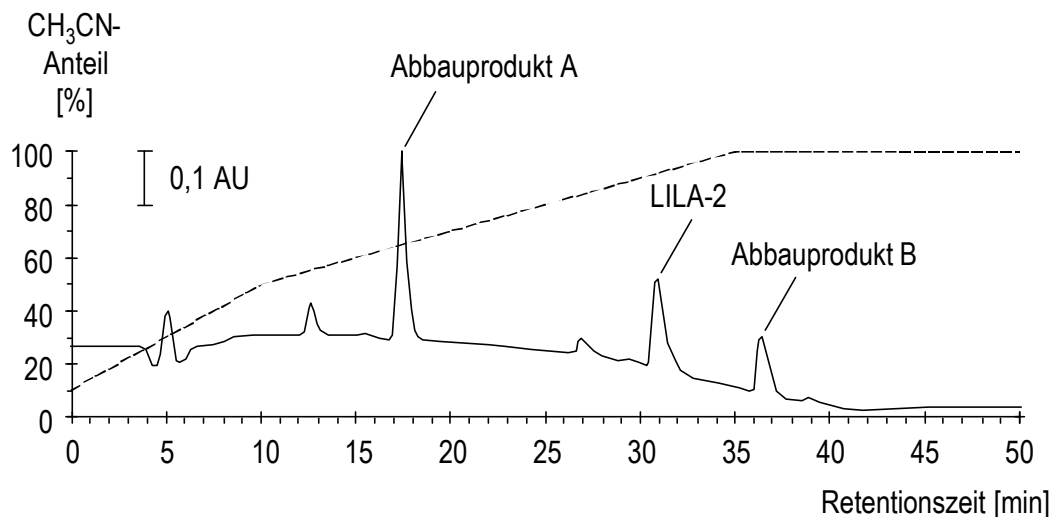


Abbildung 3-24: Rechromatographie einer mehrere Monate in Methanol/ $CHCl_3$ gelagerten LILA-2 Probe aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203 \text{ nm}$ und der CH_3CN -Anteil (----) im Laufmittel.

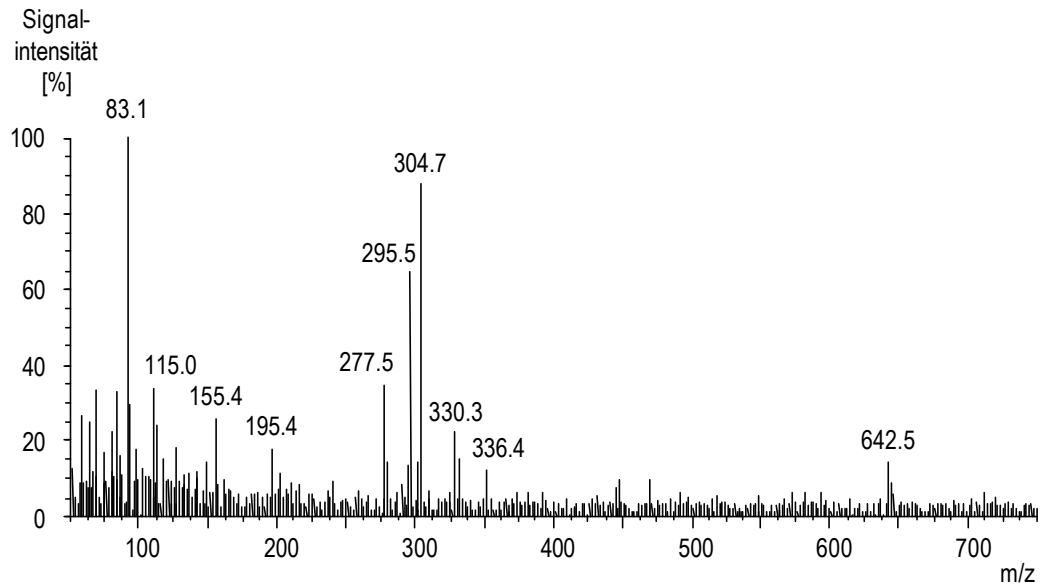


Abbildung 3-25: LILA-2 bildet bei Kontakt mit Methanol Linolsäuremethylester (MW = 294; MH^+ bei $m/z = 295$). Eine LILA-2 Probe aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in $CHCl_3/CH_3OH$ gelagert, die entstandenen Abbauprodukte anschließend an einer Umkehrphasen-Chromatographie getrennt (C8-Säule, CH_3CN -Gradient) und die Fraktion, die bei 18 min (Abbauprodukt A) eluiert wird, mittels Elektrospray-Ionisation massenspektrometrisch untersucht.

Signale, die Mono-acyl-harnstoffen entsprechen könnten, ließen sich in Proben synthetischer Bis-acyl-harnstoffe nachweisen. Ein Bis-linolyl-harnstoff zeigte nach Lagerung ein Massesignal bei $m/z = 323$ (Abbildung 3-26), was einem Mono-linolyl-harnstoff entsprechen könnte (MH^+). Das Signal bei $m/z = 645$ könnte ebenfalls vom Mono-linolyl-harnstoff stammen (M_2H^+).

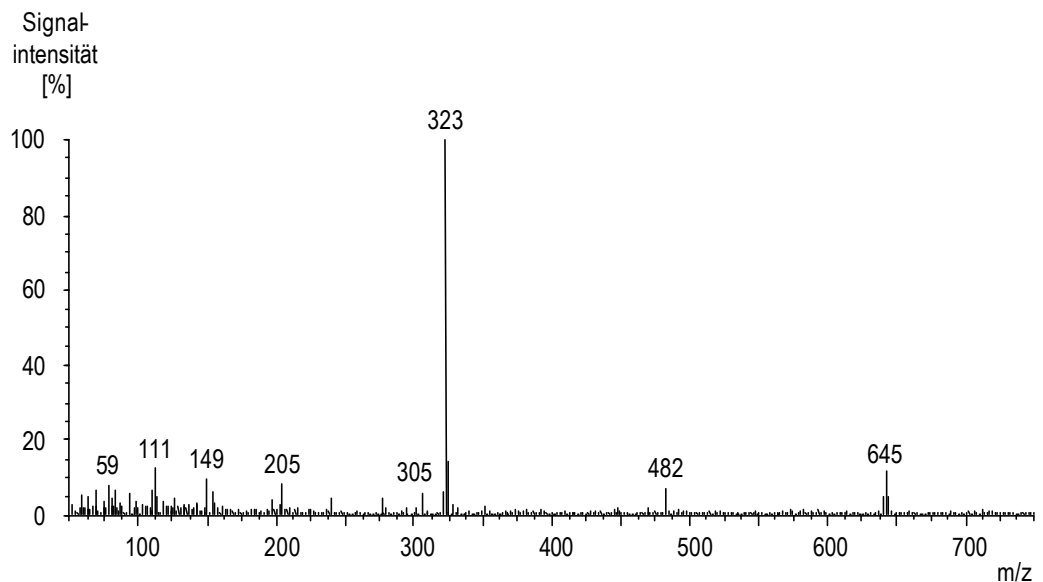


Abbildung 3-26: Synthetische Bis-acyl-harnstoffe bilden Mono-acyl-harnstoffe (MW = 322; MH^+ bei $m/z = 323$) als Abbauprodukt. Ein chromatographisch gereinigter synthetischer Bis-linolyl-harnstoff wurde in $CHCl_3/CH_3OH$ gelagert und anschließend mittels Elektrospray Ionisation massenspektrometrisch analysiert.

Mono-acyl-harnstoff-derivate können auch als Nebenprodukt bei der Synthese von Bis-acyl-harnstoffen entstehen: Das Chromatogramm eines vorgereinigten synthetischen Bis-linolyl-harnstoffes (Abbildung 3-28 A) zeigt einen Peak bei einer Retentionszeit von 18 min. Verlagert man während der Synthese das Reaktionsgleichgewicht durch Harnstoffüberschuss in Richtung Mono-acyl-harnstoff (Standard: Harnstoff: Fettsäurechlorid 1:2; Harnstoffüberschuss: 2:1), so wird dieser Peak anteilig stärker. Bei der Fraktion mit 18 min Retentionszeit handelt es sich somit möglicherweise um Mono-acyl-harnstoff. Dieser scheint auch als Methanolyseprodukt zu entstehen, wie die massenspektrometrischen Analysen in Abbildung 3-26 zeigen.

Darüber hinaus wurde ein weiteres Abbauprodukt nachgewiesen (Abbauprodukt B, Abbildung 3-24) welches durch Kontakt von LILA-2 mit Methanol entsteht. Es könnte sich dabei um den Methylester der Fettsäure handeln, die im jeweiligen LILA-Molekül gebunden ist. Die Hypothese konnte mit Hilfe einer Methylester-Referenz bestätigt werden (Abbildung 3-28). Diese Beobachtung spricht für hohes Acylierungspotential von Bis-acyl-harnstoffen.

Weiterhin ließ sich in einer Probe synthetischen Bis-linolyl-harnstoffes mittels HPLC-MS (Elektrospray-Ionisation) ein Signal nachweisen ($m/z = 295$; Abbildung 3-27), das dem Linolsäuremethylester entspricht. Die massenspektrometrischen Signale des Linolsäuremethylesters (Abbildung 3-27) finden sich auch im Massenspektrum des natürlichen LILA-2 (Abbildung 3-25), was darauf hin deutet, dass Linolsäuremethylester möglicherweise auch als Abbauprodukt des natürlichen LILA-2 entsteht.

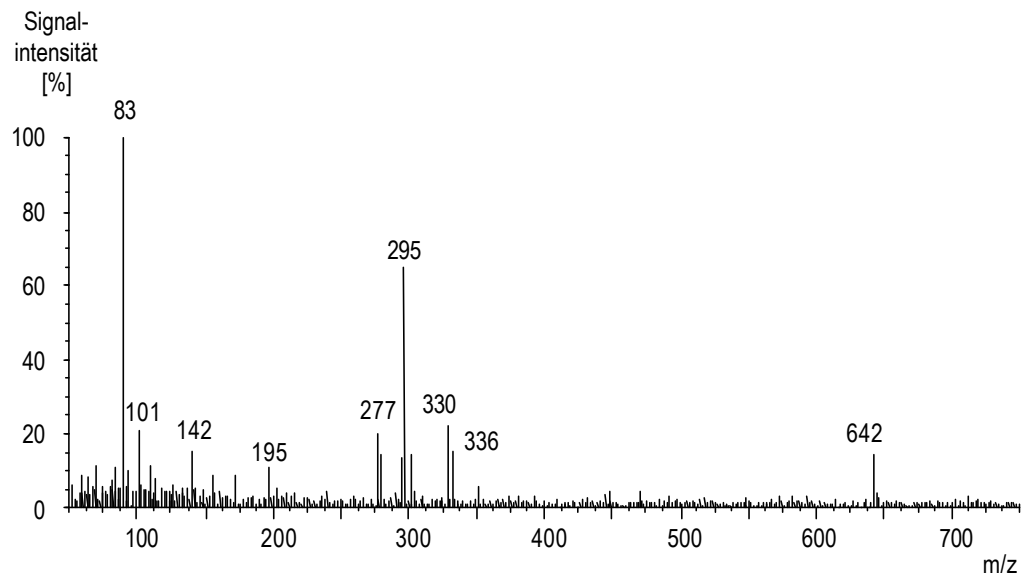


Abbildung 3-27: Synthetische Bis-acyl-harnstoffe bilden Fettsäuremethylester nach Kontakt mit Methanol. Ein synthetischer Bis-linolyl-harnstoff wurde in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ gelöst und mittels HPLC-MS (positive Elektrospray-Ionisation) analysiert.

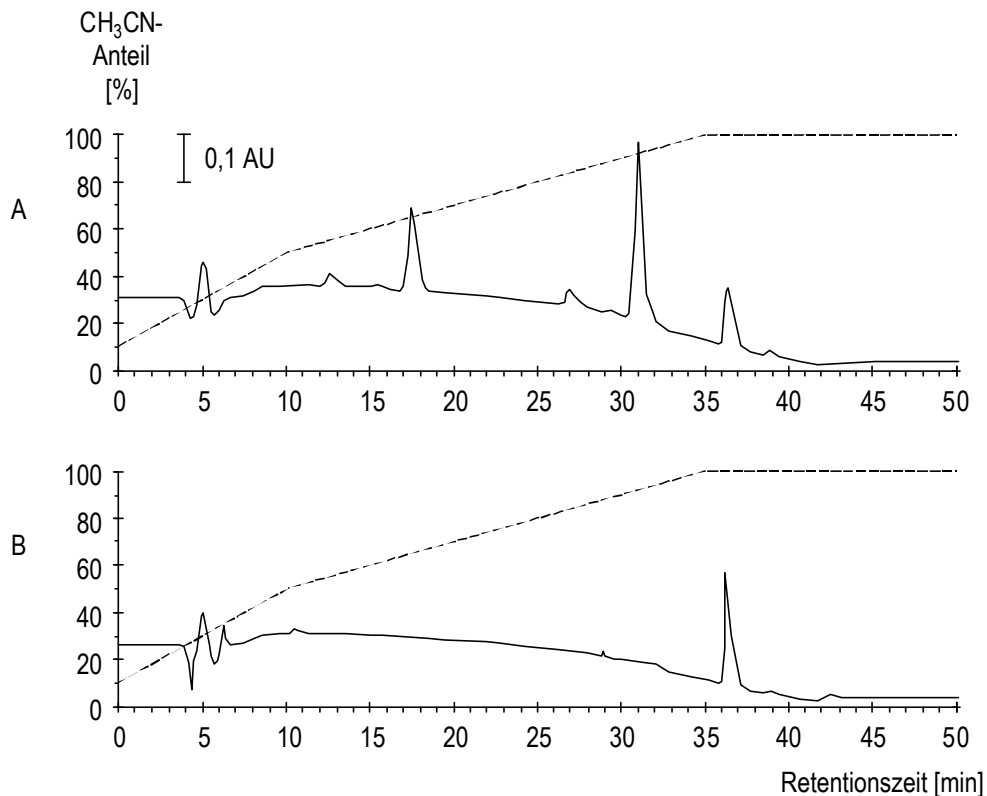
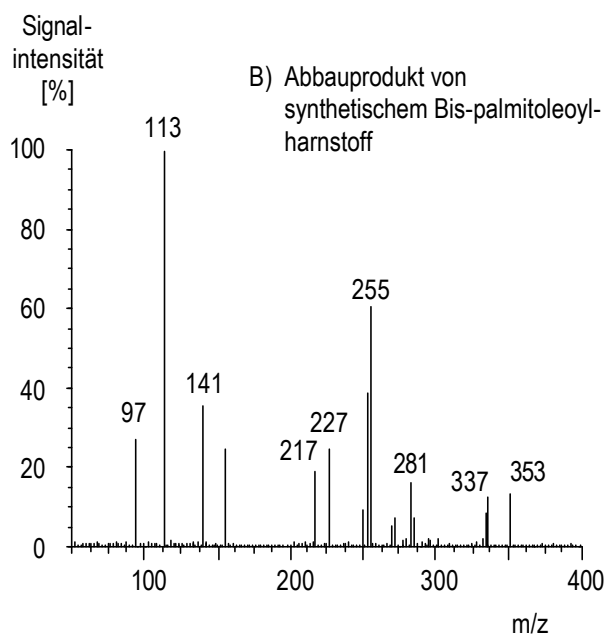
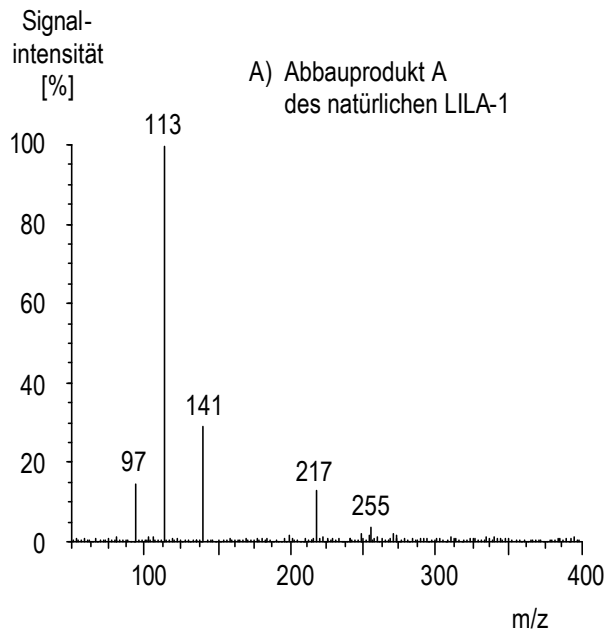


Abbildung 3-28: Methylesterbildung durch Kontakt von Bis-linolyl-harnstoff mit Methanol. Die in Chromatogramm A) dargestellte Probe wurde zuvor über eine Umkehrphasen-HPLC (C8-Säule, CH₃CN-Gradient) gereinigt, in CHCl₃/CH₃OH aufgenommen und im selben HPLC-System rechromatographiert. Chromatogramm B) zeigt ein Linolsäurechlorid, das zuvor mit Methanol behandelt wurde. Das entstandene Linolsäuremethylester wurde anschließend chromatographisch überprüft (HPLC-System identisch zu dem in A) verwendeten). Dargestellt ist die UV-Absorption bei $\lambda = 203$ nm. Retentionszeiten: 18 min: Mono-linolyl-harnstoff; 32 min Bis-linolyl-harnstoff; 37 min: Linolsäuremethylester.

Ein direkter massenspektrometrischer Vergleich der Abbauprodukte erfolgte mittels „Time of Flight-MS“ (TOF-MS). Hierzu wurde das Abbauprodukt A des natürlichen LILA-1 (Abbildung 3-24) bei Raumtemperatur für 24 h unter Argon in CHCl₃/CH₃OH gelagert und anschließend massenspektrometrisch mit einem Mono-palmitoleoyl-harnstoff verglichen. Beide Proben zeigen Signale bei $m/z = 97$; 113 ; 141 ; 217 ; und 255 wobei das Signal bei $m/z = 113$ jeweils die größte Intensität zeigt.

**Abbildung 3-29:**

Massenspektrometrischer Vergleich der Abbauprodukte von natürlichem LILA-1 und Bis-palmitoleyl-harnstoff.

*A) Eine LILA-1 Probe aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in Lösungsmittel ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) gelagert, rechromatographiert (Umkehrphasen HPLC-System, C_8 -Säule) und anschließend wurde die Fraktion, die bei 18 min eluiert, massenspektrometrisch analysiert (TOF-MS.)*

B) Ein synthetischer, chromatographisch vorgereinigter Bis-palmitoleyl-harnstoff wurde in Lösungsmittel ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) gelagert, chromatographisch getrennt (Umkehrphasen HPLC-System, C_8 -Säule), und die bei 18 min eluierende Fraktion anschließend massenspektrometrisch analysiert (TOF-MS).

Der Prozess der Hydrolyse läuft zeitlich sehr langsam ab: frisch rechromatographierte Proben enthalten weder Mono-acyl-harnstoff, noch freie Fettsäuren. Vorversuche zur Stabilität von natürlichem und synthetischem LILA ergaben, dass eine Lagerung der lyophilisierten Probe unter Argon bei -20°C zu den geringsten Abbauraten führt. Wurde LILA in Lösung gelagert, so ließ sich eine geringfügige Abhängigkeit der Hydrolyse vom pH-Wert der Lösung beobachten (Abbildung 3-30).

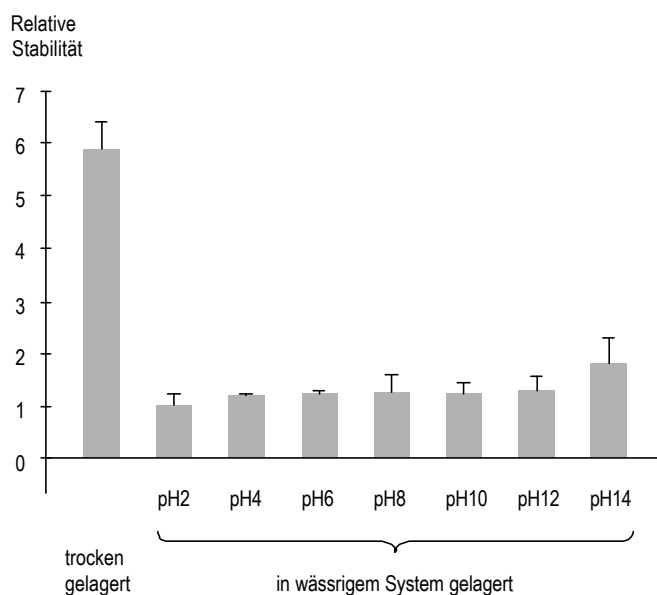


Abbildung 3-30: relative Stabilität von Bis-acyl-harnstoff, gelagert 72 h bei RT. Dargestellt ist die relative Stabilität als Quotient aus Bis-acyl-harnstoff / Mono-acyl-harnstoff (anhand der Integrationseinheiten im HPLC-System I).

3.8 Die Beilsteindatenbank enthält keine LILA-ähnlichen Substanzen

Die Kombination der massenspektrometrischen und kernspinresonanzspektroskopischen Daten und die Interpretation dieser Ergebnisse ermöglichte die Formulierung einer Strukturhypothese (Interpretation der Ergebnisse im Diskussteil: 4.1.2, Seite 81). LILA-1 besteht demnach aus zwei Palmitoleoylresten, die an eine symmetrische Kerngruppe mit 58 Masseinheiten gekoppelt sind (Abbildung 4-1, Seite 82).

Um zu überprüfen ob Substanzen, die strukturelle Ähnlichkeiten zu der in Abbildung 4-1 dargestellten Strukturhypothese besitzen, bereits bekannt sind, wurde eine computergestützte Datenbanksuche durchgeführt. Die zugrundeliegende Datenbank, Beilstein 4.0 ist mit derzeit über 5 Millionen Einträgen die weltweit größte Sammlung an chemischen Strukturdaten. Mit heuristischen Suchkriterien konnten keine Substanzen herausgefiltert werden, die strukturelle Ähnlichkeiten mit LILA-Molekülen besitzen. Einige, den Bis-acyl-harnstoffen strukturell ähnliche, symmetrische, N-substituierte Guanidine mit kurzen Resten (Diacetylmethylguanidin, Dipropylguanidin) und asymmetrische N-substituierte Guanidine mit längeren Resten (N-Cyano-N-Stearoyl-Guanidin, N-Carbamoyl-N-Hexanoyl-Guanidin) sind bereits bekannt, deren chemische Eigenschaften unterscheiden sich jedoch von denen der LILA-Moleküle.

Bis-acyl-harnstoffe sind nicht in der Datenbank enthalten, wurden jedoch im Rahmen von Untersuchungen über alternative Barbiturate bereits beschrieben (Durant, 1965). Die hierbei eingesetzten Reste (C_6H_5 und $C_{10}H_{11}$) decken sich nicht mit den in LILA-Präparationen identifizierten Fettsäuren.

3.9 Synthetische Bis-acyl-harnstoffe sind nicht zytotoxisch

Nachdem gezeigt wurde, dass die untersuchten chemischen Eigenschaften der Bis-acyl-harnstoffe denen der natürlichen LILAs glichen, wurden die biologischen Eigenschaften untersucht. In einem qualitativen Experiment wurden Bis-acyl-harnstoffe auf ihre Fähigkeit untersucht, die Freisetzung der Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten zu stimulieren. Bei Stimuluskonzentrationen, die zu einer Freisetzung der Myeloperoxidase führten, konnte durch Färbung mit einer Trypanblau-Lösung keine Lyse der Zellen nachgewiesen werden. Erst Kon-

zentrationen über 1 mM wirkten lytisch auf Leukozyten. HPLC-Fractionen, die freie Fettsäuren enthielten (Produkte der Hydrolyse) wirkten ebenfalls lytisch auf neutrophile Granulozyten. Um genauere Aussagen über die Konzentrationsbereiche machen zu können, wurde eine Dosis-Wirkungskurve für die Ca^{2+} -Mobilisierung, Freisetzung der Myeloperoxidase und Chemotaxis durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff in neutrophilen Granulozyten erstellt (3.10).

3.10 Neutrophile Granulozyten reagieren auf synthetische Bis-acyl-harnstoffe dosisabhängig.

Ein wichtiges Kriterium für einen biologischen Stimulus ist die Dosisabhängigkeit der zellulären Reaktion. Untersucht wurde chromatographisch vorgereinigter synthetischer Bis-palmitoleoyl-harnstoff. Für die Dosis-Wirkungskurve der Freisetzung der Myeloperoxidase, der Chemotaxis sowie der Ca^{2+} -Mobilisierung in neutrophilen Granulozyten wurde Bis-palmitoleoyl-harnstoff aus einer identischen Präparation verwendet.

Zur Ermittlung der Freisetzung der Myeloperoxidase wurden neutrophile Granulozyten mit Cytochalasin B vorinkubiert und anschließend mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff stimuliert. Die freigesetzte Enzymmenge wurde indirekt über die umgesetzte Menge Phenylidiamin (synthetisches Substrat der Myeloperoxidase) photometrisch bestimmt (2.8.3, Seite 21).

Die chemotaktische Wirkung von Bis-palmitoleoyl-harnstoff auf neutrophile Granulozyten wurde mittels eines indirekten Chemotaxis-Tests untersucht. Frisch isolierte neutrophile Granulozyten wurden mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff stimuliert. Die Quantifizierung der migrierten Zellen erfolgte indirekt über die photometrische Messung der Umsetzung von p-Nitrophenyl- β -D-glukuronid durch die zelleigene β -Glukuronidase (2.8.2, Seite 20).

Um die Ca^{2+} -Mobilisierung in neutrophilen Granulozyten zu messen, wurden FURA-2-beladene Zellen mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff stimuliert. Über die veränderte Fluoreszenzwellenlänge des Ca^{2+} -gebundenen FURA-2 konnte die Menge der eingeströmten Kalziumionen ermittelt werden (2.8.4, Seite 22).

Die Dosis-Wirkungskurve der Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten zeigt einen sigmoidalen Verlauf mit einer ED_{50} von 380 nM. Die ED_{50} -Konzentration der Chemotaxis liegt mit 115 nM unter dem Wert der Enzymfreisetzung. Die Ca^{2+} -Mobilisierung in neutrophilen Granulozyten konnte bereits bei Konzentrationen ab 12 nM nachgewiesen werden (ED_{50} ca. 7,5 nM).

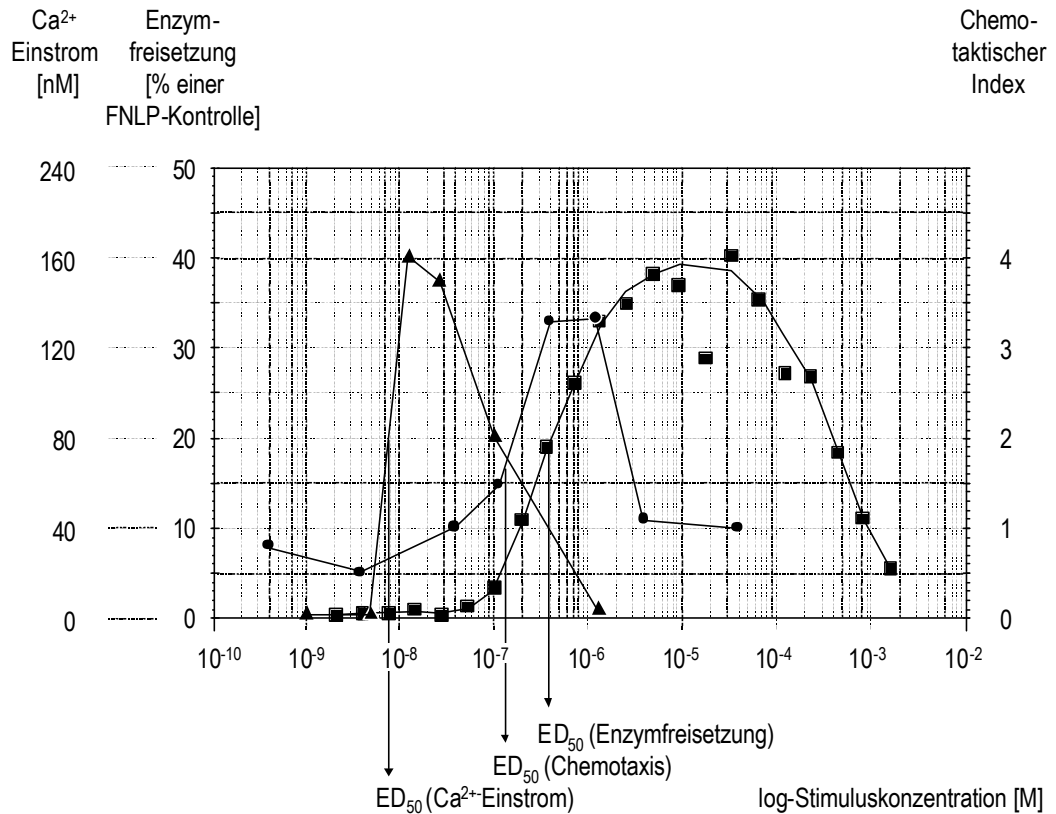


Abbildung 3-31: Dosis-Wirkungskurven zellulärer Reaktionen neutrophiler Granulozyten auf Bis-palmitoleoyl-harnstoff. Bis-palmitoleoyl-harnstoff wurde nach der Synthese chromatographisch gereinigt. Dargestellt ist der Ca²⁺-Einstrom in die Zelle (●), die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit Cytochalasin B (■) und der chemotaktische Index (▲) als Funktion der Bis-acyl-harnstoff-konzentration.

3.11 Bis-palmitoleoyl-harnstoff und natürliches LILA-1 zeigen ähnliche Dosis-Wirkungskurven

Um zu überprüfen, ob sich die durch natürliches LILA-1 und Bis-palmitoleoyl-harnstoff ausgelösten zellulären Reaktionen ähneln, wurden die Dosis-Wirkungskurven der Freisetzung der Myeloperoxidase aus PMN von LILA-1 aus *Saccharomyces cerevisiae* mit denjenigen synthetischer Bis-palmitoleoyl-harnstoff-präparationen verglichen (Abbildung 3-32).

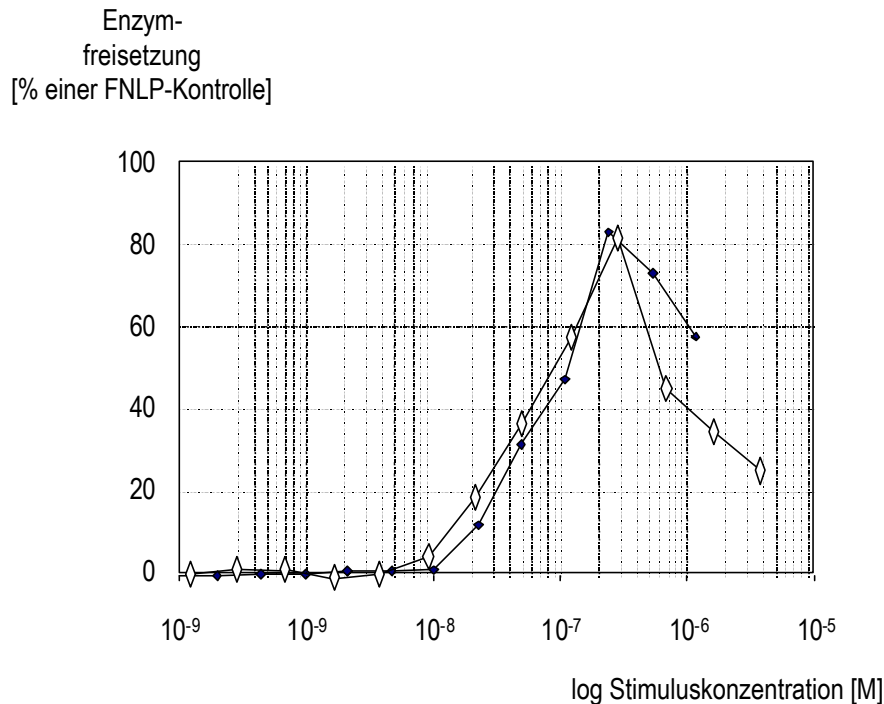


Abbildung 3-32: Vergleich der Dosis-Wirkungskurve der Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten von Synthetischem Bis-palmitoleoyl-harnstoff (—◆—) und LILA-1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (—◇—). Die Leukozytenaktivatoren wurden chromatographisch gereinigt und anschließend parallel in einem Enzymfreisetzungstest mit 10^6 PMN (der gleichen Zellpräparation) pro Versuchsansatz inkubiert. Die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase wurde photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die Freisetzung der Myeloperoxidase (% einer 10^{-7} M FMLP-Kontrolle) als Funktion der Stimuluskonzentration.

3.12 Mono-acyl-harnstoff ist biologisch inaktiv

Die Hydrolyse von Bis-acyl-harnstoffen zu Mono-acyl-harnstoff und der entsprechenden Fettsäure könnte zu veränderten biologischen Antworten führen. Um zu klären, ob Mono-acyl-harnstoff die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten stimulieren kann, wurde chromatographisch vorgereinigter, synthetischer Mono-palmitoleoyl-harnstoff auf diese Eigenschaft hin untersucht. Mono-palmitoleoyl-harnstoffkonzentrationen von 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 1 mM führten zu keiner Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten. Eine Überprüfung der Zellen mit Hilfe einer Trypanblaulösung zeigte keine lytischen Eigenschaften des Mono-palmitoleoyl-harnstoffes in den verwendeten Konzentrationen.

3.13 Mono-acyl-harnstoff inhibiert nicht die durch Bis-acyl-harnstoff induzierte Freisetzung der Myeloperoxidase

Um die Frage zu klären, ob Mono-acyl-harnstoff in der Stimulusprobe die durch Bis-acyl-harnstoff induzierte Freisetzung der Myeloperoxidase inhibieren kann, wurden neutrophile Granulozyten mit Mono-acyl-harnstoff vorinkubiert (Mono-palmitolein-harnstoffkonzentrationen: 12 nM – 320 μ M). Anschließend

wurden die Zellen mit Bis-acyl-harnstoff stimuliert. Es konnte keine Verringerung der Enzymfreisetzung in Abhängigkeit von der Mono-acyl-harnstoffmenge beobachtet werden (Abbildung 3-33). Inhibitorische Funktionen von Mono-acyl-harnstoffen, beispielsweise als Substratanalogen, können somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Enzymfreisetzung durch
1 μM Bis-palmitoleoyl-harnstoff
[% einer FNLP-Kontrolle]

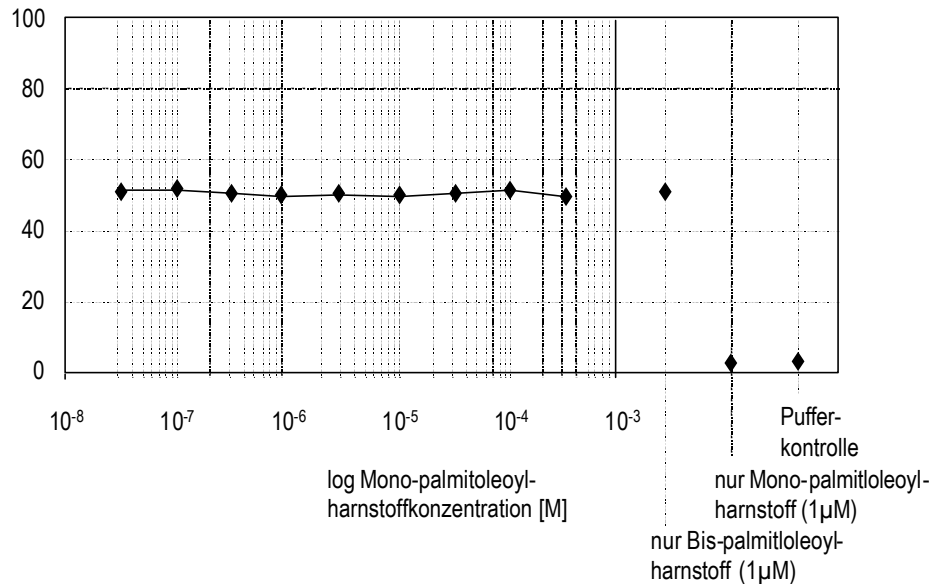


Abbildung 3-33: Mono-palmitoleoyl-harnstoff, der biologisch inaktiv ist, inhibiert die durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff induzierte Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nicht. Die chromatographisch vorgereinigten Substanzen wurden mit 10^6 PMN pro Versuchsansatz inkubiert. Die freigesetzte Enzymmenge wurde photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die durch 1 μM Bis-palmitoleoyl-harnstoff induzierte Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (% einer 10^{-7} M FMLP-Kontrolle) als Funktion der Mono-palmitoleoyl-harnstoff-konzentration. Als weitere Kontrollen dienten Ansätze, in denen ausschließlich mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff bzw. Mono-palmitoleoyl-harnstoff stimuliert wurde (rechts).

3.14 Keratinozyten exprimieren IL-8 mRNA nach Stimulation mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff

Die Rolle von lipidartigen Leukozytenaktivatoren als Entzündungsmediatoren sollte durch Untersuchungen zur Induzierbarkeit der Expression von IL-8 mRNA in Keratinozyten durch LILA geklärt werden. Hierzu wurden primäre humane Keratinozyten mit verschiedenen Konzentrationen von synthetischen Bis-palmitoleoyl-harnstoffen stimuliert, und anschließend mittels RT-PCR die relative Menge der IL-8 mRNA ermittelt. Die Expression von IL-8 mRNA in primären humanen Keratinozyten lässt sich durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff konzentrationsabhängig, wie in Abbildung 3-34 gezeigt, stimulieren.

Um zu überprüfen, ob die von Michael Bülow (1997) beobachtete IL-8 Expression durch LILA eine Folge der Kontamination der Probe mit 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin ist, wurde in einem weiteren Experiment die Induzierbarkeit der IL-8-mRNA-Expression durch synthetisches 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin (LPC) untersucht. Hierbei konnte keine Induzierbarkeit der IL-8 mRNA durch synthetisches LPC nachgewiesen werden (Abbildung 3-34).

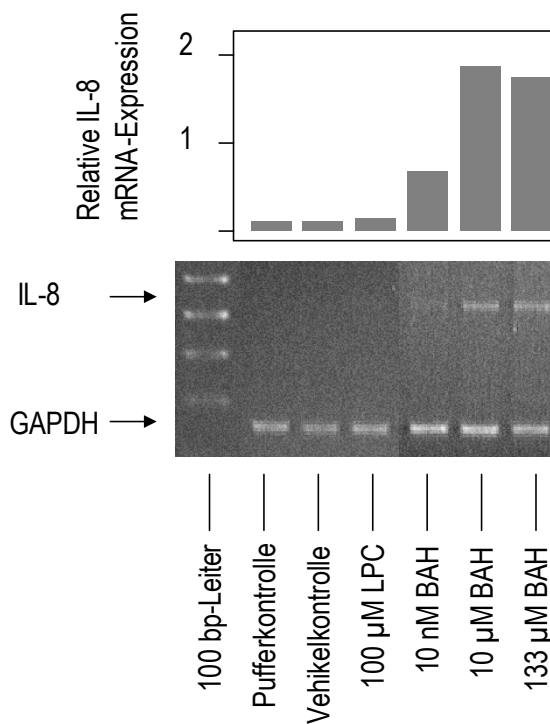


Abbildung 3-34: Bis-palmitoleoyl-harnstoff stimuliert die IL-8-mRNA-Expression in primären Keratinozyten. Primäre humane Keratinozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Bis-palmitoleoyl-harnstoff (BAH) sowie 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin (LPC) stimuliert. Als Kontrollen dienten Zellpopulationen, die mit Puffer bzw. Vehikel (alkalischer Puffer (pH 13), der nach Zugabe des Stimulus auf pH 7 neutralisiert wurde) stimuliert wurden. Dargestellt sind die spezifischen PCR-Amplifikate von IL-8 (951 bp) und GAPDH (360 bp) und die densitometrische Auswertung der relativen IL-8 mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression des GAPDH-Gens.

3.15 Untersuchungen zur Signaltransduktion von LILA-1 in neutrophilen Granulozyten

Im Rahmen der Untersuchungen zu biologischen Aktivitäten von LILA sollten weitere Hinweise auf die Existenz eines möglichen zellulären Rezeptors gesammelt werden. In diesem Zusammenhang sollte auch der Signaltransduktionsweg von LILA untersucht werden. Hierzu wurde die unter 2.8.5 beschriebene Methode der Messung des Ca^{2+} -Einstromes mittels FURA-2/AM verwendet.

Die eingesetzten Bis-acyl-harnstoffe wurden kurz vor der Messung chromatographisch von Abbauprodukten wie Fettsäuren getrennt. Bis-acyl-harnstoffe, die nicht vor der Messung gereinigt worden waren, lieferten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die dargestellten Grafiken zeigen repräsentative Messungen. Der Basalwert der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration variierte, je nach Neutrophilenpopulation, zwischen 50 nM und 70 nM. Die Zugabe der Stimulatoren und Inhibitoren im Versuchsansatz erfolgte in Volumina bis maximal 3 μl (pro 3000 μl Versuchsansatz). Im Anschluss an jede Messung wurde eine Kontrollstimulation mit FNLP (100 nM), sowie eine Kalibrierung durchgeführt. In den Darstellungen ist dieser Teil der Messung meist nicht gezeigt.

3.15.1 Leukozytenaktivatoren induzieren den Kalziumeinstrom konzentrationsabhängig

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich bei der LILA-induzierten Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten um eine dosisabhängige zelluläre Reaktion handelt (3.10, Seite 55). Es sollte nun überprüft werden, ob die LILA-induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung in neutrophilen Granulozyten ebenfalls eine dosisabhängige Reaktion ist. Hierzu wurden neutrophile Granulozyten in einem Ca^{2+} -Mobilisierungsexperiment mit verschiedenen Konzentrationen von Bis-acyl-harnstoffen stimuliert. Eine sukzessive Zugabe von Bis-palmitoleoyl-harnstoff in nanomolaren Konzentrationen (Endkonzentrationen: 27 nM; 54 nM; 81 nM; ...) führte zu keinem Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 3-35 oben).

Bei Überschreiten einer Schwellenkonzentration im Bereich 60 nM bei nicht sukzessiver Zugabe, ließ sich ein signifikantes Signal ($\Delta[\text{Ca}^{2+}] = 150 \text{ nM}$) beobachten (Abbildung 3-35 Mitte). Auch eine Mehrfachstimulation war bei diesen Stoffmengen möglich. Wurde die Konzentration erhöht, so reagierten die Zellen bei einer zweiten Stimulation mit einem wesentlich schwächeren Signal (Abbildung 3-35 unten).

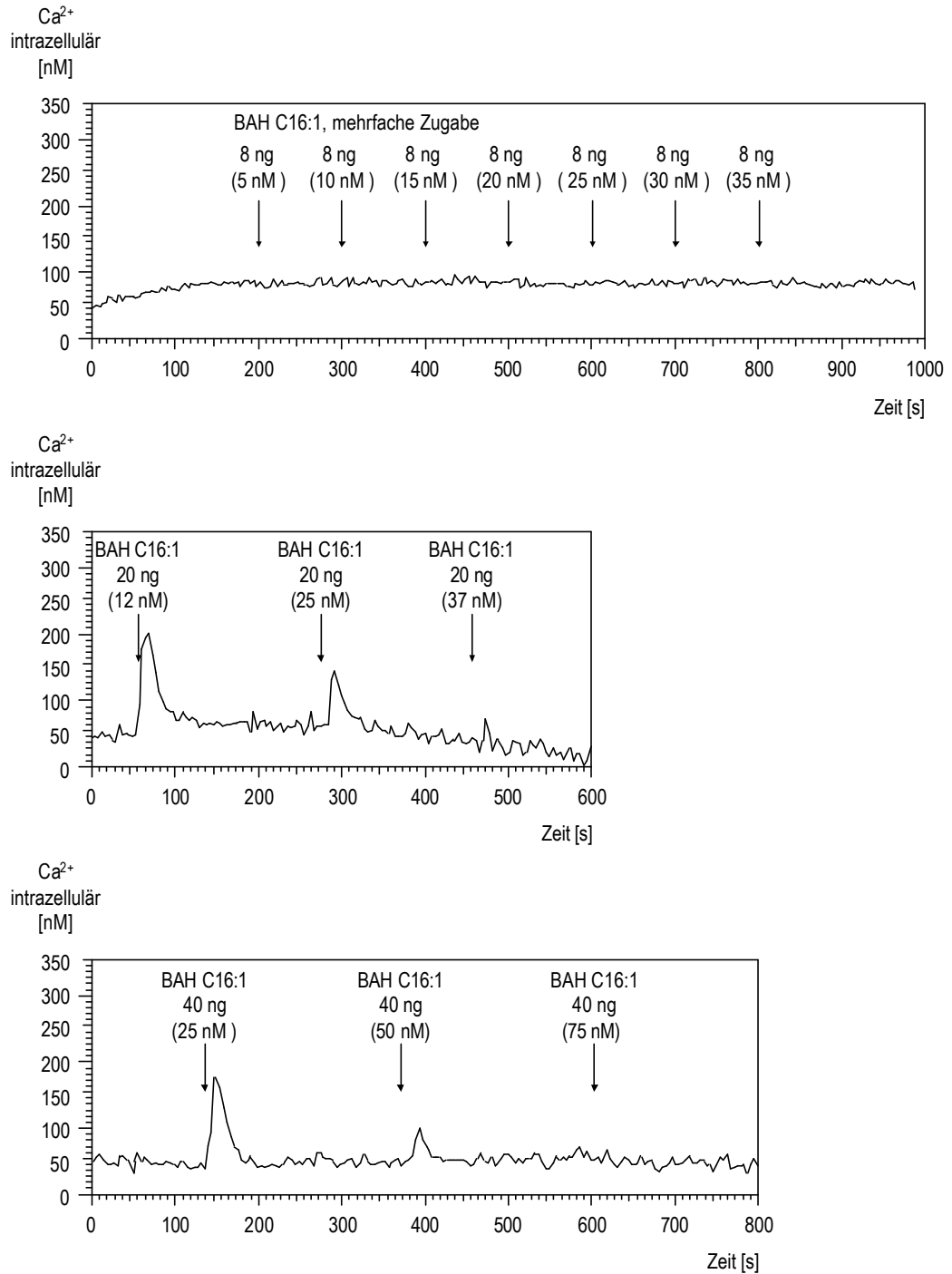


Abbildung 3-35: Ca^{2+} -Einstrom in neutrophilen Granulozyten, induziert durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff (BAH C16:1) in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Mengenangabe der Stimuli bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz. Dargestellt ist der auf die Ca^{2+} -Konzentration normierte Quotient aus der Fluoreszenz der Ca^{2+} -gebundenen Fura-II-Form und der Fluoreszenz der Ca^{2+} -freien Fura-II-Form.

3.15.2 Das LILA-Signal ist G-Protein vermittelt

Im Rahmen der Untersuchungen zur Signaltransduktion sollte zunächst geklärt werden, ob die durch LILA induzierten Signale G-Protein vermittelt sind. *Bordetella pertussis*-Toxin ist ein selektiver Inhibitor der G-Proteine (Hazes *et al.*, 1996). Das Toxin wurde wie in 2.8.5 (Seite 23) beschrieben eingesetzt. Als Kontrollexperiment dienten Granulozyten, die ohne Hemmstoff bei identischen Bedingungen inkubiert worden waren. *Bordetella pertussis*-Toxin führte zu einer vollständigen Inhibition des Ca^{2+} -Einstromes (Abbildung 3-36). Im Kontrollexperiment ohne *Bordetella pertussis*-Toxin reagierten die Zellen auf den Stimulus. Die Weiterleitung des durch LILA induzierten Signals könnte somit ein G-Protein vermittelter Prozess sein.

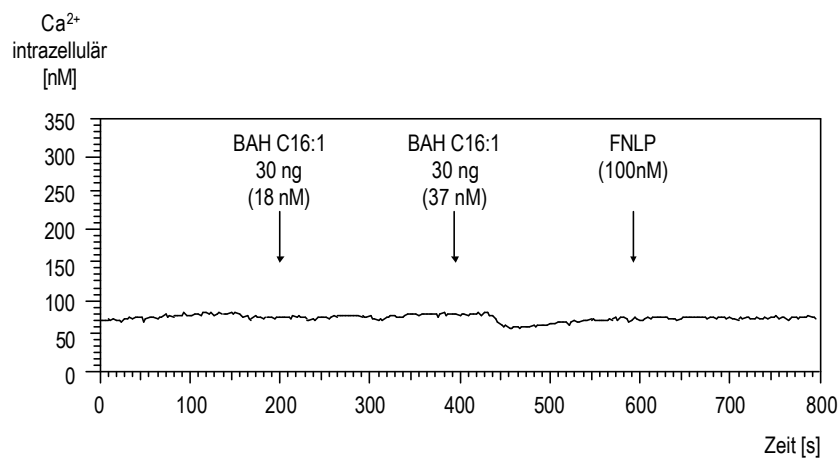


Abbildung 3-36: Ca^{2+} -Einstrom in neutrophile Granulozyten, induziert durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff (BAH C16:1) nach Vorbehandlung der Zellen mit *Bordetella pertussis*-Toxin (45×10^6 Zellen/ml für 2 h bei 37°C mit $4 \mu\text{g/ml}$ Pertussis-Toxin inkubiert). Die Mengenangabe der Stimuli bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz. Dargestellt ist der auf die Ca^{2+} -Konzentration normierte Quotient aus der Fluoreszenz der Ca^{2+} -gebundenen Fura-II-Form und der Fluoreszenz der Ca^{2+} -freien Fura-II-Form.

3.15.3 Das LILA-vermittelte Signal ist von einer membranassoziierten Phospholipase C abhängig

Die membranassoziierte Phospholipase C in neutrophilen Granulozyten kann durch Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) inhibiert werden (Naccache *et al.*, 1985). Um die Rolle dieser Phospholipase bei der zellulären Verarbeitung der LILA-Signale zu ermitteln, wurde PMA wie in 2.8.5 (Seite 23) aufgeführt eingesetzt.

Die Zugabe von PMA (200 nM Endkonzentration) konnte den durch Bis-acylharnstoffe induzierten Ca^{2+} -Einstrom vollständig deaktivieren (Abbildung 3-37 unten). Als Kontrollexperiment diente eine zweifache Stimulation mit Bis-acylharnstoff ohne Zugabe des Inhibitors (Abbildung 3-37 oben). In einem weiteren Kontrollexperiment wurde auf die erste Stimulation mit Bis-acylharnstoff verzichtet, um eine mögliche Absättigung der Rezeptoren zu verhindern (nicht abgebildet). Die Kalziumfreisetzung konnte so ebenfalls durch PMA inhibiert werden.

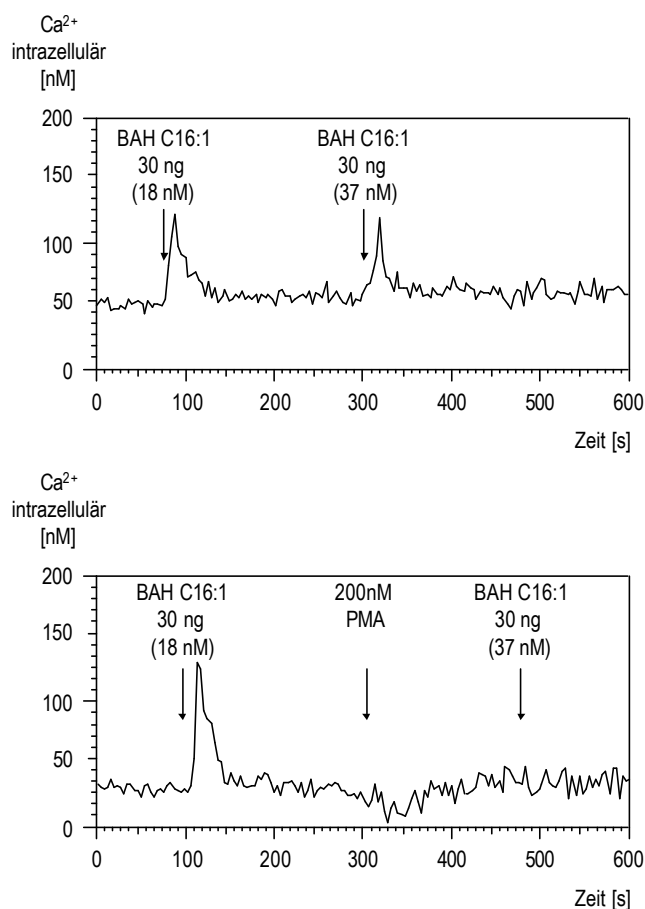


Abbildung 3-37: Ca^{2+} -Einstrom in neutrophile Granulozyten, induziert durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff (BAH C16:1). Nach Stimulation von 15×10^6 PMN wurde Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) zugegeben. Die Mengenangabe der Stimuli bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz. Dargestellt ist der auf die Ca^{2+} -Konzentration normierte Quotient aus der Fluoreszenz der Ca^{2+} -gebundenen Fura-II-Form und der Fluoreszenz der Ca^{2+} -freien Fura-II-Form.

3.15.4 Das LILA-Signal ist von der membranassoziierten Carboxylmethyltransferase abhängig.

Acetyl-Geranoyl-Geranoyl-Cystein (AGGC) ist ein selektiver Inhibitor der membranassoziierten Carboxylmethyltransferase, die in neutrophilen Granulozyten vorkommt (Philips *et al.*, 1993). Dieser Inhibitor blockiert die rezeptorvermittelte Signaltransduktion auf Ebene der „low molecular weight G-proteins“ (LMWG). Das Kalziumsignal konnte mit AGGC (Endkonzentration 5 μM) vollständig deaktiviert werden (Abbildung 3-38). Als Kontrollexperimente dienten Stimulationsversuche ohne Inhibitor (nicht abgebildet). In einem weiteren Experiment wurde der Inhibitor ohne Erststimulation zugegeben, um eine mögliche Absättigung der Rezeptoren zu verhindern. Das Kalziumsignal konnte so ebenfalls deaktiviert werden (nicht abgebildet). Das LILA-Signal ist somit von der membranassoziierten Carboxylmethyltransferase abhängig.

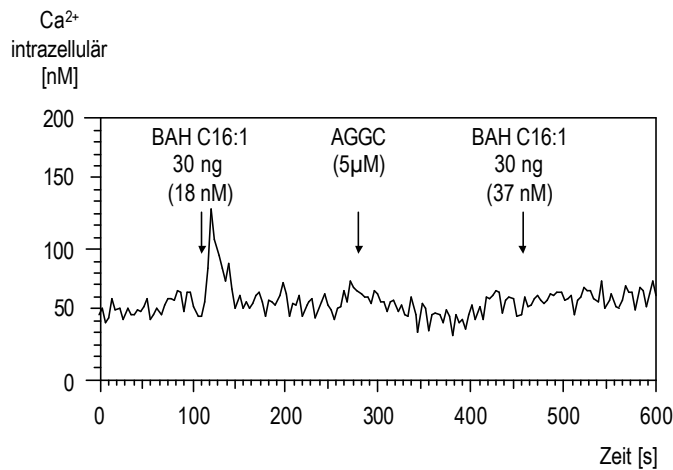


Abbildung 3-38: Ca^{2+} -Einstrom in neutrophile Granulozyten, induziert durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff (BAH C16:1). Nach Stimulation von 15×10^6 PMN mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff wurde Acetyl-Geranoyl-Geranoyl-Cystein (AGGC) zugegeben, anschließend erneut mit Bis-palmitoleoyl-harnstoff stimuliert. Die Mengenangabe der Stimuli bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz. Dargestellt ist der auf die Ca^{2+} -Konzentration normierte Quotient aus der Fluoreszenz der Ca^{2+} -gebundenen Fura-II-Form und der Fluoreszenz der Ca^{2+} -freien Fura-II-Form.

3.15.5 Das LILA-Signal ist von der N-Myristoyl-Transferase abhängig

Aufgrund der molekularen Struktur von LILA und aufgrund von experimentellen Beobachtungen (3.7) kann diesen Molekülen ein Übertragungspotential für Acylgruppen zugerechnet werden: Sie können als Acylierungsreagenzien fungieren. Die Übertragung einer solchen Gruppe spielt auch im Verlauf der Signaltransduktion eine wichtige Rolle. G-Proteine besitzen keine Transmembrandonäne und werden mittels Fettsäuren wie Palmitoleinsäure und Myristoyleinsäure in der Membran verankert (Spiegel *et al.*, 1991).

Die in Neutrophilen vorkommende N-Myristoyl-Transferase kann durch ein Substratanalogon (DL- α Hydroxymyristoyleinsäure; HMA) inhibiert werden. Um zu überprüfen, ob Bis-acyl-harnstoffe hier die Funktion der Myristoyltransferase übernehmen können, wurde das Enzym inhibiert. Da die in der Literatur angegebenen Konzentrationen zur Inhibition (Nadler *et al.*, 1993) sich als zytotoxisch erwiesen, wurden im folgenden Experiment geringere Hemmstoffkonzentrationen eingesetzt. Die Methode wurde wie in 2.8.5 (Seite 23) aufgeführt, modifiziert. Die gewählten Versuchsbedingungen sind für die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit FNLP bzw. LILA optimiert. Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe einer Trypanblau-Lösung überprüft.

Eine Inhibitorkonzentration von 10 μM führte zu einer Schwächung des LILA-induzierten Signals, das FNLP-Signal verringerte sich nicht (Abbildung 3-39 oben). Eine Inhibitorkonzentration von 50 μM HMA führte zu einer fast vollständigen Deaktivierung des LILA- und des FNLP-Signals (Abbildung 3-39 Mitte). Hydroxymyristeinsäure in einer Endkonzentration von 100 μM inhibierte beide Signale vollständig (Abbildung 3-39 unten). Als Kontrollexperiment diente eine Messung ohne Inhibitor (nicht abgebildet). Eine Überprüfung der Zellen mit Trypanblau ergab, dass die eingesetzten Substanzen nicht lytisch auf neutrophile Granulozyten wirkten.

Das LILA-induzierte Signal ist somit von der N-Myristoyl-Transferase abhängig. Eine Acylierungsfunktion der Bis-acyl-harnstoffe konnte mit diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

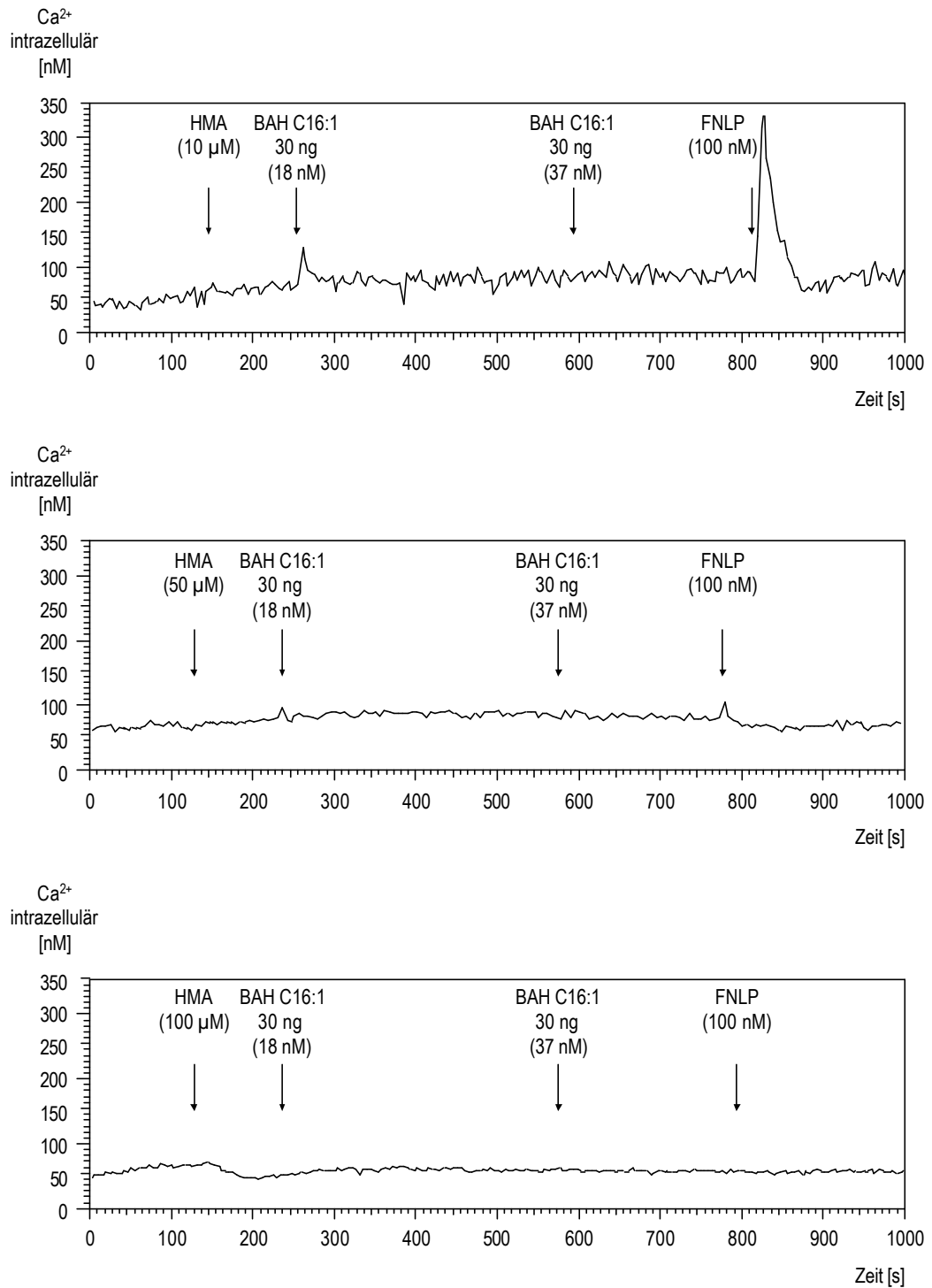


Abbildung 3-39: Einfluss von Hydroxymyristoyleisäure auf den durch Bis-palmitoleoyl-harnstoff induzierten Ca^{2+} -Einstrom in neutrophile Granulozyten. Die Mengenangabe der Stimuli bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz. Dargestellt ist der auf die Ca^{2+} -Konzentration normierte Quotient aus der Fluoreszenz der Ca^{2+} -gebundenen Fura-II-Form und der Fluoreszenz der Ca^{2+} -freien Fura-II-Form. Eine Überprüfung der Zellen mit Trypanblau ergab, dass die eingesetzten Substanzen nicht lytisch auf neutrophilen Granulozyten wirkten.

3.15.6 Verschiedene Bis-acyl-harnstoffe zeigen unterschiedliche Signalcharakteristika

Bis-linolyl-harnstoff (entspricht LILA-2) führt in neutrophilen Granulozyten ebenfalls zu biologischen Antworten. Im nachfolgend beschriebenen Experiment wurden Granulozyten mit diesem Stimulus zum Ca^{2+} -Einstrom angeregt. Bei Konzentrationen unter $10 \mu\text{M}$ ließ sich keine Ca^{2+} -Mobilisierung nachweisen.

Als besonderes Charakteristikum zeigte dieser Stimulus ein schwächeres aber länger anhaltendes Signal als Bis-palmitoleoyl-harnstoffe. Eine anschließende Stimulation mit FNLP ergab ein deutliches Signal (Abbildung 3-41). Darüber hinaus konnte mittels Trypanblau-Färbung gezeigt werden, dass Bis-linolyl-harnstoff in den eingesetzten Konzentrationen keine lytischen Eigenschaften hat.

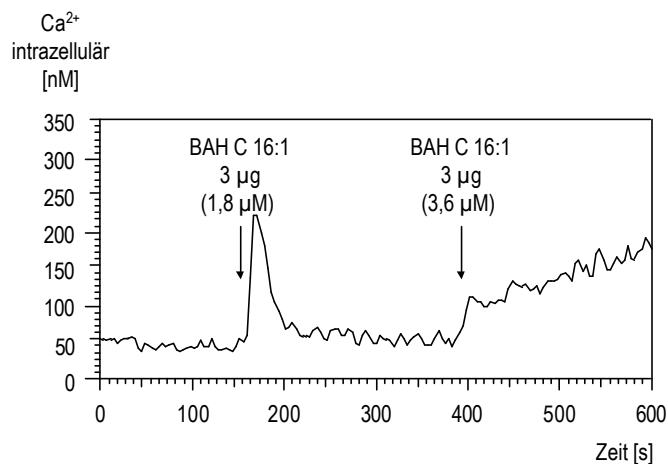


Abbildung 3-40: Bis-palmitoleoyl-harnstoff (BAH C16:1) induziert Ca^{2+} -Einstrom in neutrophile Granulozyten. Die Mengenangabe bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz.

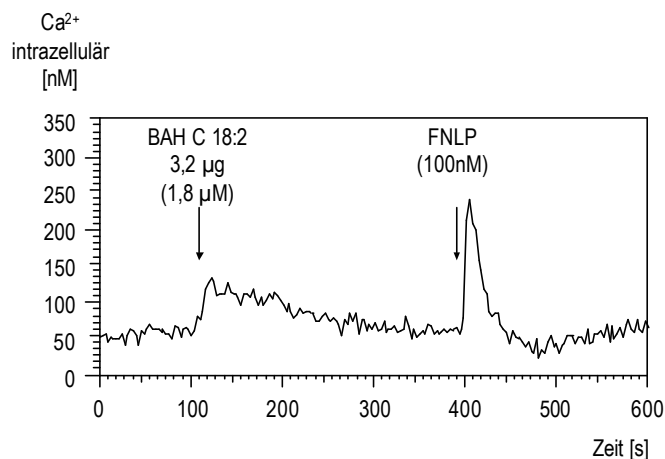


Abbildung 3-41: Bis-linolyl-harnstoff (BAH C18:2) induziert Ca^{2+} -Einstrom in neutrophile Granulozyten. Die Mengenangabe bezeichnet die zugegebene Stoffmenge, der Wert in Klammer bezeichnet die resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz.

3.16 Natürliche LILAs verhalten sich wie ihre synthetischen Äquivalente

Um die Strukturhypothese zu verifizieren, wurden in einer Reihe unterschiedlicher Experimente die Eigenschaften des natürlichen LILAs aus *Saccharomyces cerevisiae* mit synthetisch hergestellten Leukozytenaktivatoren verglichen. In Tabelle 2-1 sind die Vergleichsdaten zusammengefasst. Die Daten sprechen für die Übereinstimmung der Strukturhypothese mit dem natürlichen LILA.

Eigenschaft	natürliches LILA-1 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	synthetischer Bis-palmitoleoyl-harnstoff
ist chemotaktisch für PMN	x	x
Induziert MPO-Freisetzung in PMN	x	x
wirkt dosisabhängig auf PMN	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
Retentionszeit im HPLC-System I	32 min	32 min
Retentionszeit im HPLC-System II	18-20 min	~18 min
UV-Absorptionsmaximum	$\lambda = 203$ nm	$\lambda = 203$ nm
ist kein Lysophosphatidylcholin	x	x
ist nicht durch Phospholipasen deaktivierbar	x	x
ist pH 13-löslich	x	x
enthält Palmitoleinsäure (gebunden)	x	x
massenspektrometrische Signale bei m/z=	547, 254 ⁽²⁾	547, 254 ⁽²⁾
liefert Abbauprodukte mit m/z=	112, 141, 255 ⁽³⁾	112, 141, 255 ⁽³⁾
Abbauprodukte werden eluiert bei	17 min	17 min
Zellantwort abhängig von CMT	x	x
Zellantwort abhängig von PLC	x	x
Zellantwort G-Protein-vermittelt	x	x

Tabelle 3-5: Zusammenstellung und Vergleich der Eigenschaften vom natürlichem und synthetischem LILA am Beispiel von LILA-1 und Bis-palmitoleoyl-harnstoff.

⁽¹⁾ Dosis-Wirkbeziehungen für LILA-1 sind in Abbildung 3-31 dargestellt. Die ED₅₀-Konzentrationen betragen für die Ca²⁺-Mobilisierung ca. 7,5 nM, für die Chemotaxis 115 nM und für die Freisetzung der Myeloperoxidase 380 nM.

⁽²⁾ Die Massen repräsentieren: m/z = 547: Molekulation, m/z = 254: Fettsäure, daneben existieren noch weitere Signalübereinstimmungen. Ein direkter Vergleich der Massenspektren von LILA-2 und Bis-linoyl-harnstoff ist in Abbildung 3-23 dargestellt.

⁽³⁾ Die Abbauprodukte (z.B.: Fettsäuremethylester) entstehen durch längere Lagerung oder durch Kontakt mit Methanol.

CMT = membranständige Carboxylmethyltransferase, MPO = Myeloperoxidase, PLC = Phospholipase C, PNM = Neutrophile Granulozyten.

3.17 Isolierung und Charakterisierung weiterer LILAs

Neben LILA-1 und LILA-2 enthielt die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* noch mindestens sechs weitere lipidartige Leukozytenaktivatoren. Die Chemotaxine LILA-3 bis LILA-8 wurden nach den für LILA-1 und LILA-2 beschriebenen Methoden gereinigt. Aus der Reinigung und Identifizierung lassen sich bereits Substanzcharakteristika ableiten, die für alle LILAs zutreffen: Die Löslichkeit bei pH 13, lipidartige Substanzeigenschaften und die Fähigkeit, humane neutrophile Granulozyten zur Freisetzung der Myeloperoxidase zu stimulieren.

Auf den folgenden Seiten sind die Chromatogramme von LILA-3 bis LILA-8 dargestellt. Eine strukturelle Charakterisierung war nur für LILA-5 möglich (3.19, Seite 75).

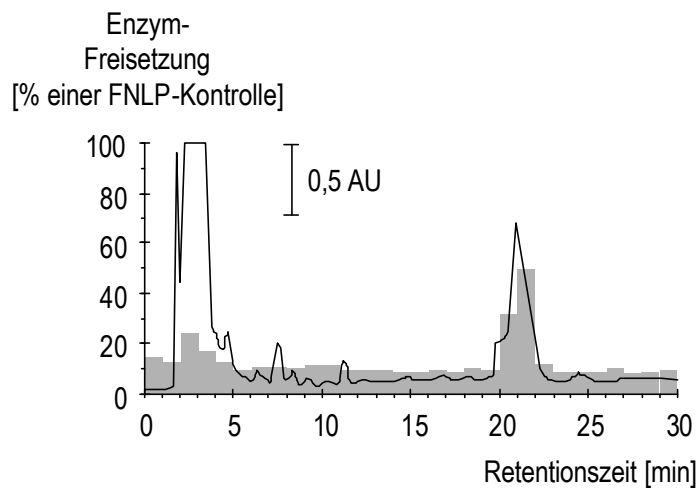


Abbildung 3-42: Zweiter HPLC-Schritt einer LILA-Fraktion, die im ersten HPLC-System (Abbildung 3-1) bei 21 min eluiert wurde (= LILA-3). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (■). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%).

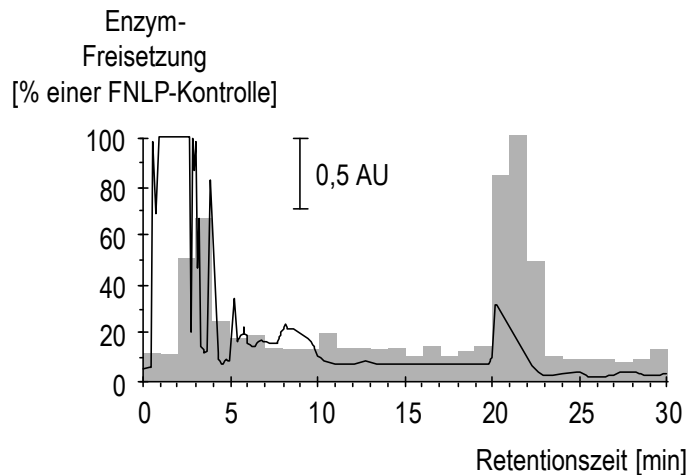


Abbildung 3-43: Zweiter HPLC-Schritt einer LILA-Fraktion, die im ersten HPLC-System (Abbildung 3-1) bei 25 min eluiert wurde (= LILA-4). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (■). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%).

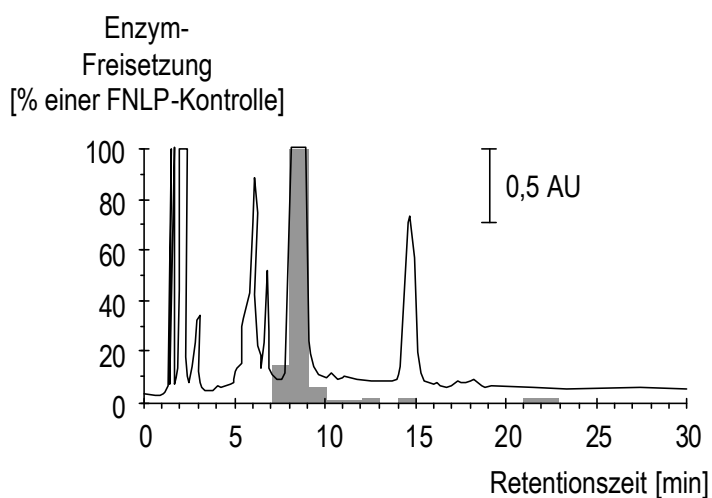


Abbildung 3-44: Zweiter HPLC-Schritt einer LILA-Fraktion, die im ersten HPLC-System (Abbildung 3-1) bei 28 min eluiert wurde (= LILA-5). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (■). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%).

Die LILA-5 Präparation aus der in Abbildung 3-44 dargestellten chromatographischen Trennung wurde massenspektrometrisch untersucht. Neben einem synthetischen Antioxidans (3.19, Seite 75) konnten keine weiteren Substanzen in LILA-5 Präparationen nachgewiesen werden. Abbildung 3-45 und Abbildung 3-46 zeigen die Leukozytenaktivatoren LILA-6, LILA-7 und LILA-8 aus *Saccharomyces cerevisiae*.

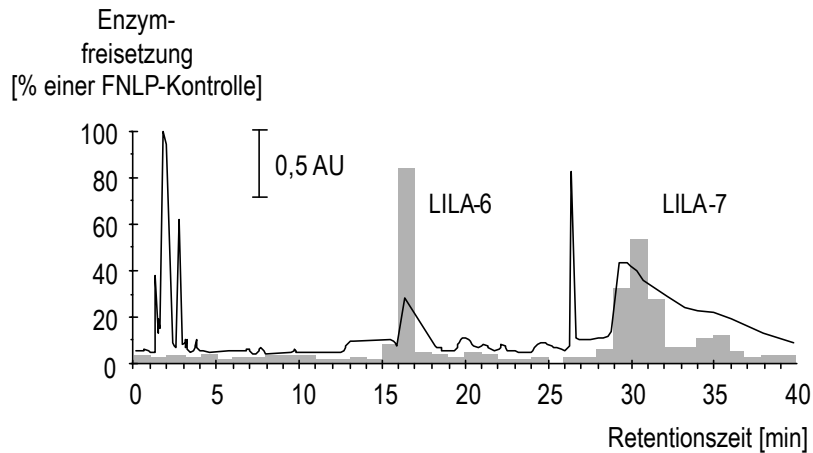


Abbildung 3-45: Zweiter HPLC-Schritt einer LILA-Fraktion, die im ersten HPLC-System (Abbildung 3-1) bei 35 min eluiert wurde (= LILA-6 und LILA-7). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (■). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^7 M FNLP normiert (= 100%).

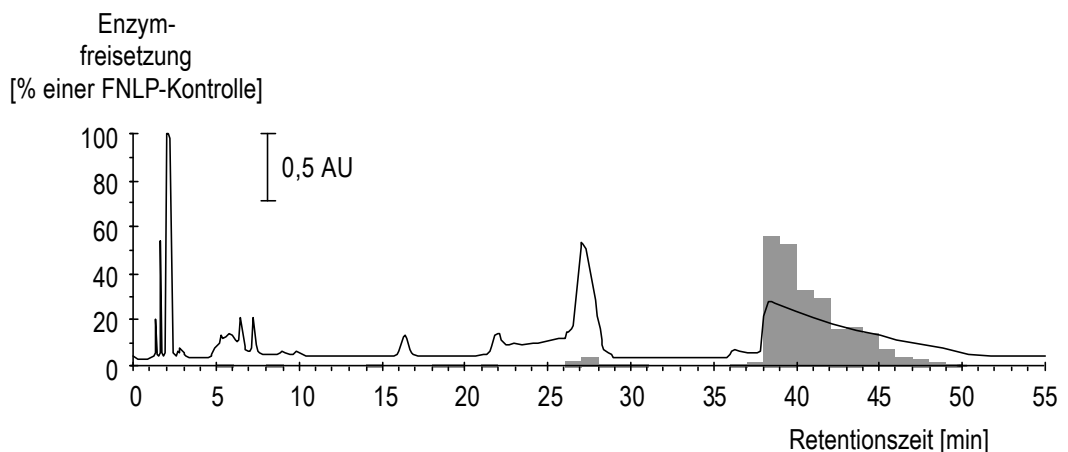


Abbildung 3-46: Zweiter HPLC-Schritt einer LILA-Fraktion, die im ersten HPLC-System (Abbildung 3-1) bei 37 min eluiert wurde (= LILA-8). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm und die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten (■). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^7 M FNLP normiert (= 100%).

3.18 Versuche zur Isolierung von LILAs aus anderen biologischen Quellen

3.18.1 Menschliches Blut enthält kein LILA

Die bislang isolierten LILAs sind bei pH 13, nicht jedoch bei pH 8 aus organischen Lösungsmitteln extrahierbar, und können aufgrund dieses Lösungsverhaltens leicht von vielen anderen Lipidmediatoren unterschieden werden. Deshalb sollte mit den gleichen Verfahren untersucht werden, ob menschliches Vollblut, pH 13-lösliche Lipide mit LILA-Aktivität enthält. Das Chromatogramm in Abbildung 3-47 zeigt, dass menschliches Blut eine Reihe pH 13-löslicher Lipide (wahrscheinlich Phospholipide) enthält, von denen keines zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führte.

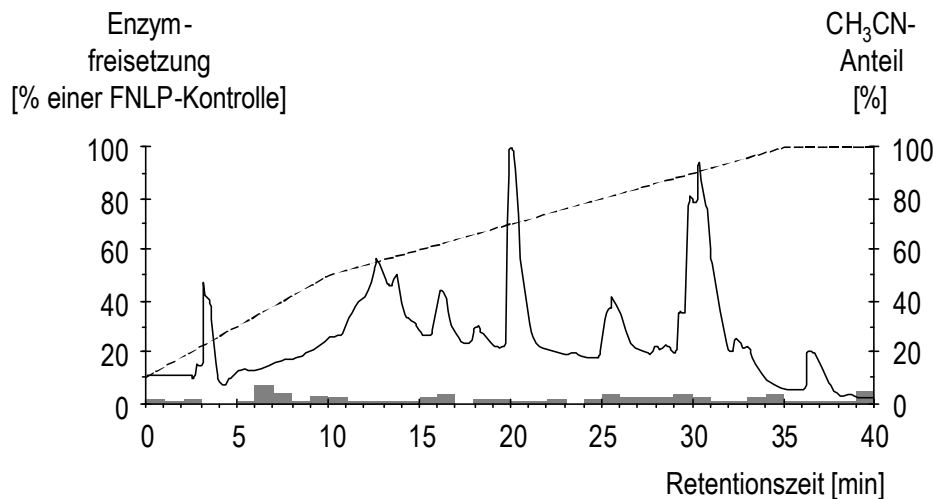


Abbildung 3-47: Chromatographische Trennung von pH 13-löslichen Lipidextrakten aus menschlichem Vollblut. 50 μ l eines Lipidextraktes wurden chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C₈-Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μ l jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase indirekt über die umgesetzte Substratmenge photometrisch bestimmt (2.8.3).

Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH₃CN-Anteil im Laufmittel (--). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%)

3.18.2 Sojabohnen-Lipidextrakte enthalten kein LILA

Um zu überprüfen, ob Pflanzen Substanzen enthalten, die ähnliche physikochemische Eigenschaften wie LILAs aufweisen, wurden Lecithinextrakte aus Sojabohnen (Sigma, Deisenhofen) alkalisch weiterextrahiert (2.7) und chromatographisch gereinigt (2.6). Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihrer Fähigkeit überprüft, die Freisetzung der Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten zu stimulieren. Die verwendeten Lipidextrakte aus Sojabohnen enthalten eine Reihe von pH 13-löslichen Lipiden, von denen jedoch keines eine signifikante biologische Aktivität zeigte (Abbildung 3-48).

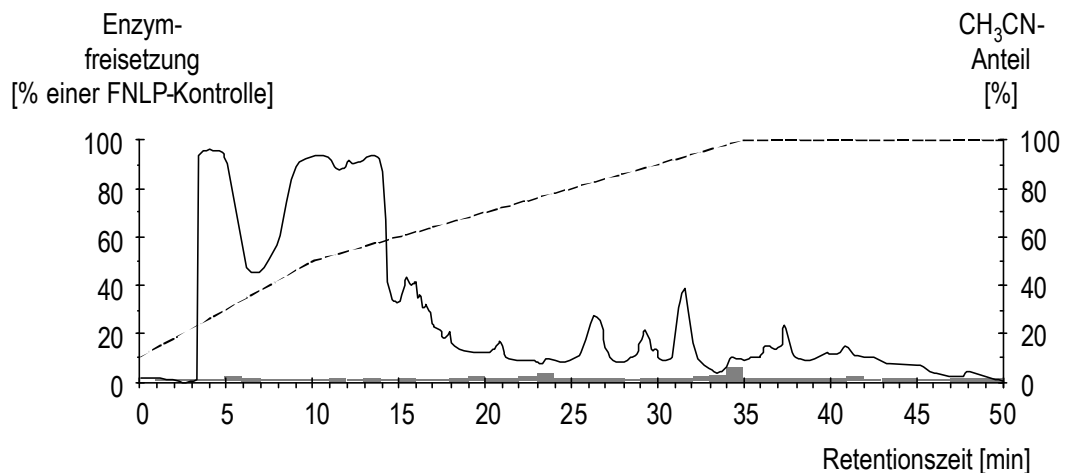


Abbildung 3-48: Chromatographische Trennung von pH 13-löslichen Lipiden aus Sojabohnen-Lecithinextrakten. 50 μ l eines Lipidextraktes wurden chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C_8 -Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μ l jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3).

Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH_3CN -Anteil im Laufmittel (--). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%)

3.18.3 Die Hefe *Pichia pastoris* enthält LILA

Neben den in vorausgehenden Arbeiten bereits untersuchten Spezies wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die apathogene Hefe *Pichia pastoris* auf LILA-Aktivität untersucht. Aus Flüssigkulturen gewonnene Hefen wurden nach der unter 2.7 (Seite 19) beschriebenen Methode aufbereitet und anschließend die pH 13-löslichen Lipide chromatographisch getrennt. Das in Abbildung 3-49 dargestellte Chromatogramm zeigt leukozytenaktivierende Fraktionen bei Retentionszeiten von 10 und 28 min.

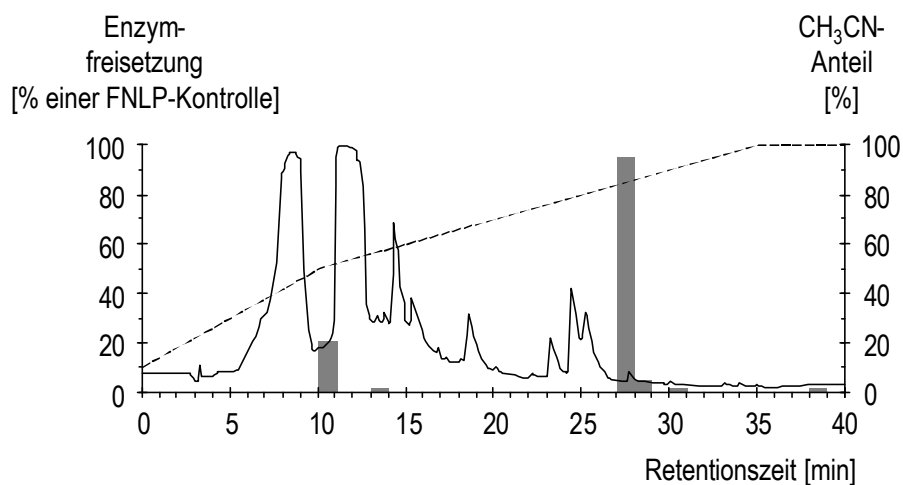


Abbildung 3-49: Chromatographische Trennung von pH 13-löslichen Lipidextrakten aus der Hefe *Pichia pastoris*. 50 μ l eines Lipidextraktes wurden chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C_8 -Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 μ l jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10^6 Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3). Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH_3CN -Anteil im Laufmittel (--). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10^{-7} M FNLP normiert (= 100%)

3.19 LILA-Präparationen enthalten ein Antioxidans als Leukozytenaktivator.

3.19.1 Massenspektrometrische Identifizierung von TBBC

Leukozytenaktivatoren aus *Saccharomyces cerevisiae*, die in dem verwendeten Umkehrphasen-HPLC-System (HPLC-System I, Tabelle 2-1) eine Retentionszeit von 28 min (= LILA-5) aufweisen, wurden zur Strukturanalyse massenspektrometrisch untersucht. Die massenspektrometrische Untersuchung von LILA-5 ergab die Masse des Moleküls bei $m/z = 358$ und Fragmentensignale bei $m/z = 343, 195, 179, 162, 136, 98$ und 62 (Abbildung 3-51). Das charakteristische Fragmentierungsmuster stimmte mit den Signalen von 4,4'-Thiobis(6-tert-Butyl-m-Cresol) (= TBBC) aus der NIST-Datenbank (NIST #50156) überein, welches ein Molekulargewicht von 358 besitzt. Abbildung 3-50 zeigt die zugehörige Strukturformel von TBBC.

Da die eingesetzte LILA-5 Probe biologische Aktivität aufwies, musste überprüft werden, ob diese Aktivität eine Eigenschaft des TBBCs ist, oder ob noch eine weitere Komponente in diesen Fraktionen für diese Aktivität verantwortlich ist. Hierzu wurde synthetisches TBBC (Sigma, Deisenhofen) hinsichtlich seiner chemischen und biologischen Eigenschaften untersucht (3.19.2).

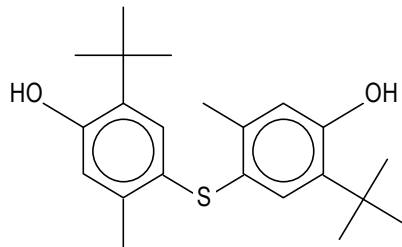


Abbildung 3-50: 4,4'-Thiobis(6-tert-Butyl-m-Cresol)
(TBBC)

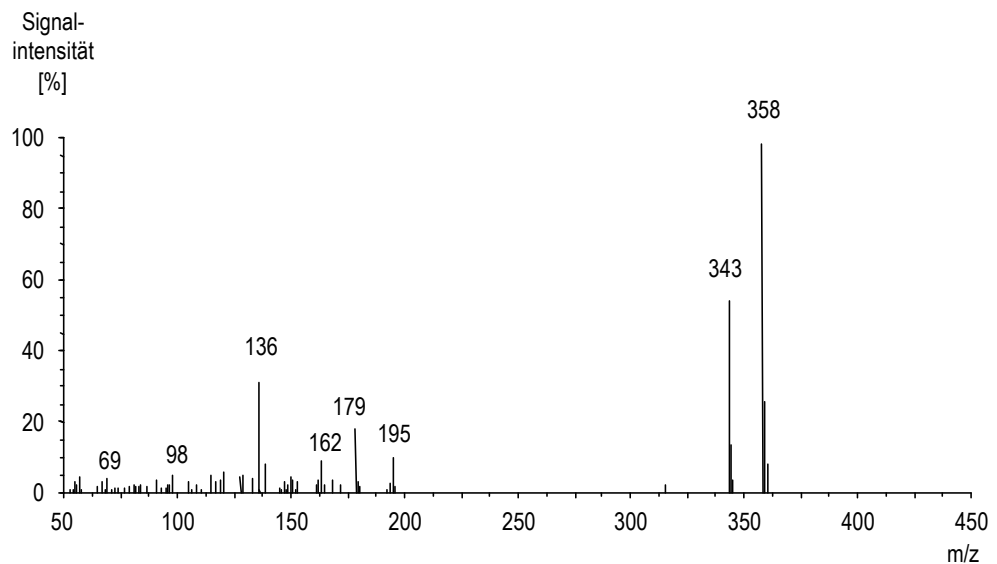
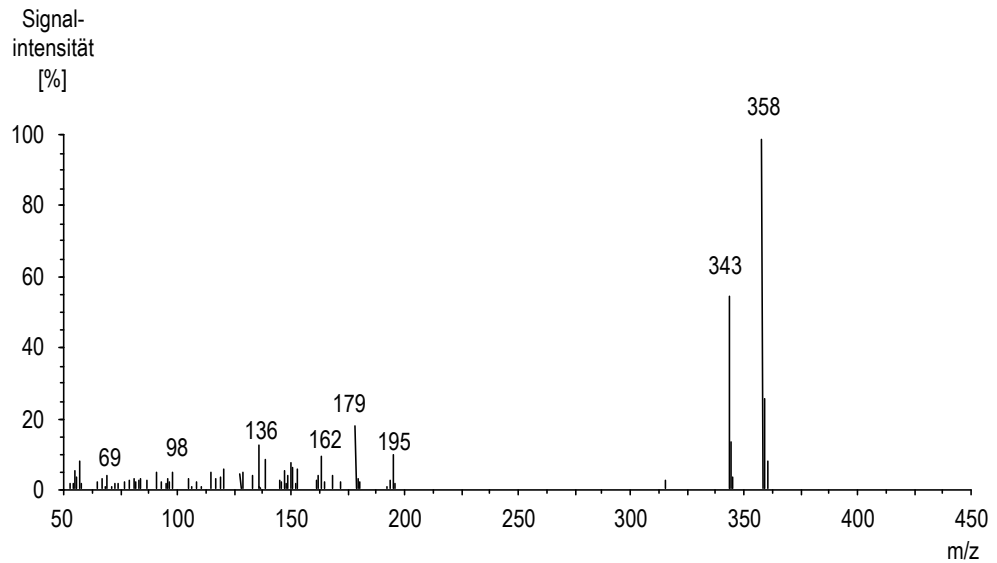


Abbildung 3-51: Spektrum einer Electron-Impact Untersuchung an LILA 28 aus *Saccharomyces cerevisiae* (oben) im Vergleich zum Spektrum von 4,4'-Thiobis(6-tert-Butyl-m-Cresol) aus der NIST-Datenbank (unten, NIST #50156)

3.19.2 Eigenschaften des in LILA-Präparationen identifizierten TBBC

Mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden konnte in LILA-Präparationen TBBC nachgewiesen werden (Abbildung 3-51). TBBC (4,4'-Thiobis(6-tert-Butyl-m-Cresol)) ist eines der am häufigsten verwendeten Antioxidantien in der chemischen Industrie. Um zu ermitteln, ob TBBC LILA-Charakteristika erfüllt, wurden die chemischen und biologischen Eigenschaften des Antioxidans untersucht.

Synthetisches, im Handel erhältliches hochreines TBBC (Sigma Deisenhofen) wurde auf sein Elutionsverhalten in den verwendeten HPLC-Systemen überprüft (HPLC-System I und II, Tabelle 2-1). TBBC stimmt in beiden zur LILA-Präparation verwendeten HPLC-Systemen mit den Retentionszeiten von LILA-5 überein.

Im ersten HPLC-System wurde TBBC bei 27-28 min eluiert (Abbildung 3-52 oben), LILA-5 bei 28 min (Abbildung 3-1, Seite 30). Im zweiten HPLC-System lag die Retentionszeit von TBBC bei 7-8 min (Abbildung 3-52 unten) und die Retentionszeit von LILA-5 bei 8-9 min (Abbildung 3-44, Seite 70).

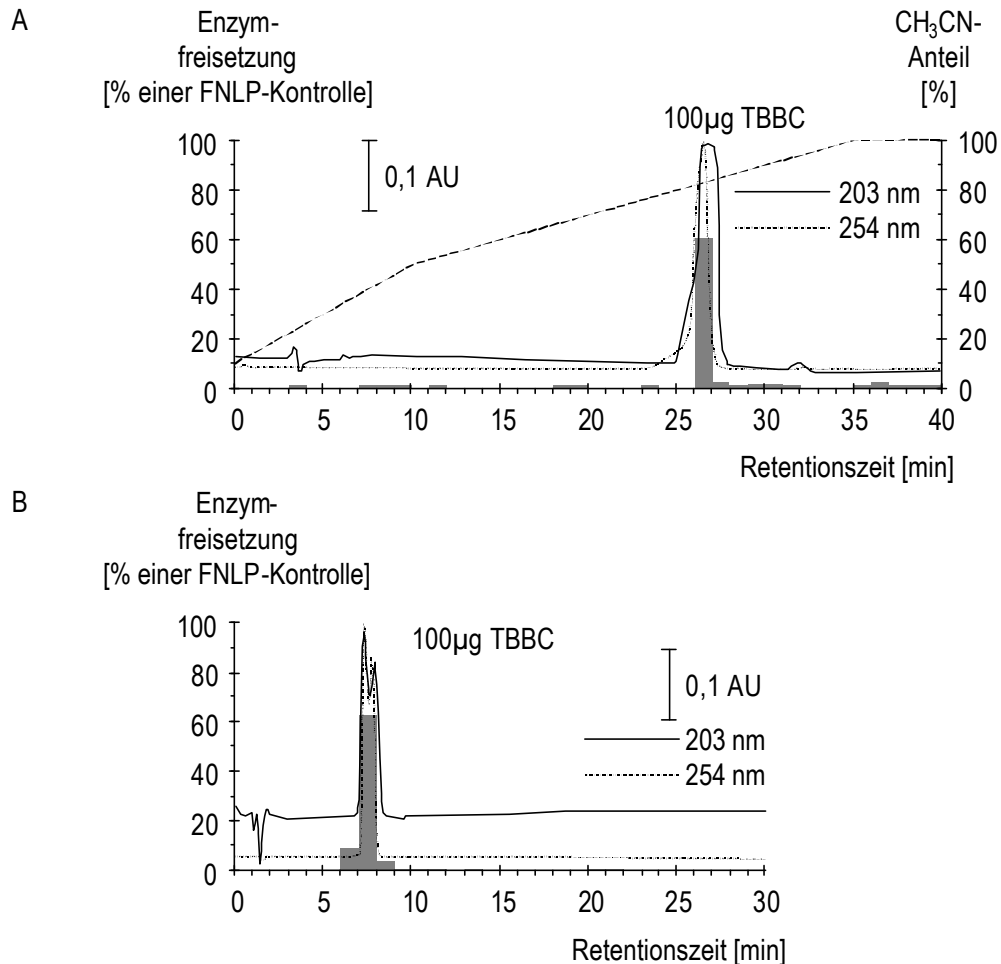


Abbildung 3-52: Chromatographische Trennung von synthetischem TBBC mit zwei verschiedenen HPLC-Systemen:

A) HPLC-System I (C₈-Säule, Umkehrphasen-HPLC, CH₃CN-Gradient, Tabelle 2-1)

B) HPLC-System II (C₁₈-Säule, Umkehrphasen-HPLC, isokratisch, Tabelle 2-1)

Die Lipidextrakte wurden chromatographisch getrennt (Umkehrphasen-HPLC, C₈-Säule) und im Minutentakt fraktioniert (Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min, HPLC-System I, Tabelle 2-1). Jeweils 10 µl jeder Fraktion wurden mit neutrophilen Granulozyten (10⁶ Zellen/Versuchsansatz) in einem Enzymfreisetzungstest inkubiert und die freigesetzte Menge der Myeloperoxidase photometrisch bestimmt (2.8.3).

Dargestellt ist die UV-Absorption (—) bei $\lambda = 203$ nm, die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit der jeweiligen Fraktion (■) und der CH₃CN-Anteil im Laufmittel (---). Die Freisetzung der Myeloperoxidase wurde auf die Freisetzung durch 10⁻⁷ M FNLP normiert (= 100%).

Um zu überprüfen, ob es sich bei der durch TBBC induzierten Freisetzung der Myeloperoxidase durch neutrophile Granulozyten möglicherweise um einen rezeptorvermittelten Prozess handelt, wurde ein Versuch zur Dosisabhängigkeit der Enzymfreisetzung durchgeführt. Gemessen wurde hierbei die Freisetzung der Myeloperoxidase aus den Leukozyten. Die Überprüfung der Zellen mit Trypanblau nach Inkubation mit TBBC ergab, dass der Stimulus nicht zytotoxisch wirkt.

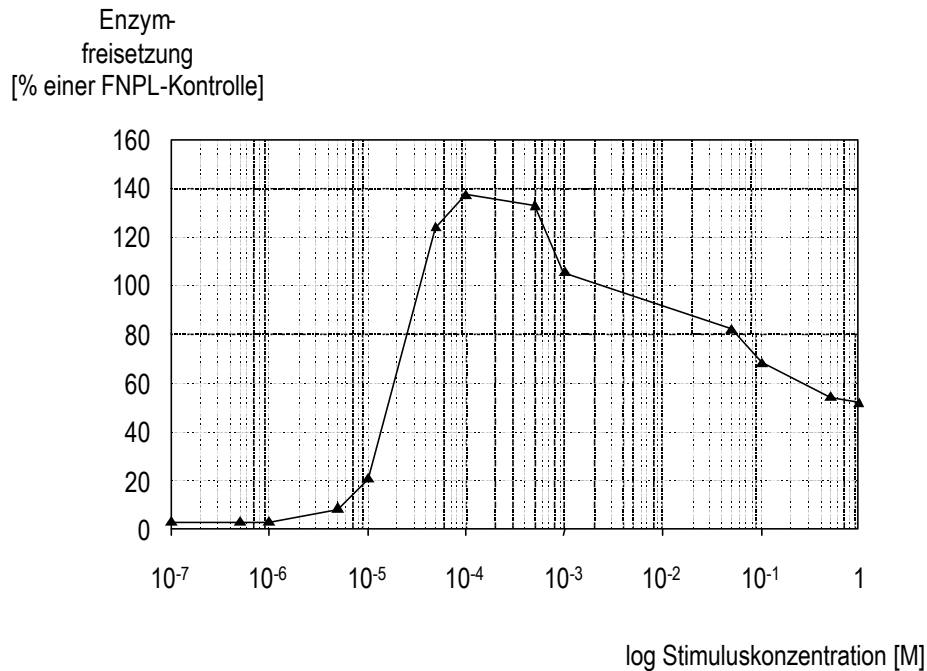


Abbildung 3-53: Dosis-Wirkungskurve der Freisetzung der Myeloperoxidase durch neutrophile Granulozyten. Neutrophile Granulozyten (10^7 Zellen/ml) wurden 30 min mit dem Stimulus bei 37°C inkubiert und die freigesetzte Enzymmenge anschließend photometrisch bestimmt. Die biologische Aktivität wurde auf die Freisetzung der Myeloperoxidase, die durch 10^{-7} M FNLP hervorgerufen wird, normiert (= 100%). Dargestellt ist die durch TBBC induzierte Freisetzung der Myeloperoxidase als Funktion der TBBC-Konzentration.

Die experimentell ermittelten Daten zeigen angenähert einen glockenförmigen Verlauf der Kurve mit einem Stimulationsmaximum bei ca. $500 \mu\text{M}$ und einer ED_{50} bei ca. $200 \mu\text{M}$. In einem weiteren Experiment wurde die Löslichkeit von TBBC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich TBBC in alkalischer Umgebung (pH 13) löst, und somit während der Präparation von Lipidextrakten aus *Saccharomyces cerevisiae* nicht abgetrennt werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Isolierung und Charakterisierung von pathogenassoziierten Molekülen aus Hefen

Neutrophile Granulozyten gehören zu den wichtigsten Zelltypen bei der Verteidigung der menschlichen Haut gegen Infektionen mit pathogenen Hefen und Dermatophyten (Rogers und Balish, 1980). Ein entscheidender Schritt in diesem Abwehrprozess ist die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das infizierte Gewebe. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die von Pilzen produzierten Signale untersucht, die zu einer Aktivierung der Neutrophilenmigration führen.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung von Abwehrzellen konnte eine komplementvermittelte Immunantwort auf Dermatophyten gezeigt werden (Cutler, 1977). Daneben wurden auch Antikörper gegen Zellinhaltsstoffe oder Oberflächenantigene der Pilze nachgewiesen (Tagami *et al.*, 1982; Kaaman, 1985). In Kulturüberständen von Dermatophyten sowie Zell-Lysaten wurde eine chemotaxinogene Wirkung dokumentiert (Tagami *et al.*, 1982; Davies und Zaini, 1984). Hierbei handelt es sich nicht um chemotaktische Substanzen, sondern um Substanzen, die im Wirtsorganismus die Bildung von Chemotaxinen anregen (Keller *et al.*, 1977). Erste Hinweise auf eine direkte, nicht komplementvermittelte Aktivierung von Neutrophilen konnten durch Experimente mit Kulturüberständen von *Candida albicans* gesammelt werden (Cutler, 1977). Die chemische Natur der Substanzen wurde hierbei nicht weiter untersucht.

Trotz dieser Hinweise auf die Chemotaxinproduktion durch Hefen wird die klinisch sichtbare Akkumulation von Leukozyten bei Infektionen meist mit dem alternativen Komplementweg erklärt (Loos, 1985), ohne dass auf die mögliche Rolle der Chemotaxine eingegangen wird.

Für bakterielle Infektionen sind direkte, ohne den Komplementweg ablaufende, Erkennungsmechanismen bereits bekannt: FMLP aus Bakterien kann neutrophile Granulozyten direkt aktivieren (Schiffmann *et al.*, 1975). Es ist demnach denkbar, dass sich im Laufe der Evolution ähnliche Erkennungsmechanismen zwischen Eukaryonten und Pilzen entwickelt haben.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten ohne die Beteiligung des Komplementsystems von Dermatophytenextrakten direkt aktiviert werden können (Kahlke, 1989; Brasch *et al.*, 1991a; Brasch *et al.*, 1991b; Brasch *et al.*, 1992). In verschiedenen zoophilen sowie antropophilen Dermatophytenarten wurden diese chemotaktisch aktiven Substanzen nachgewiesen (Kahlke, 1989; Kahlke, 1993). Die weitere Charakterisierung dieser leukozytenaktivierenden Stoffe ergab, dass unter Einfluss dieser chemotaktischen Faktoren die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Plastik und an Endothelzellen gesteigert wurde, womit in der Frühphase einer Entzündung eine notwendige Voraussetzung für das Austreten der Leukozyten aus dem Blutgefäß gegeben wäre. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das Chemotaxin aus Dermatophyten Monozyten und neutrophile Granulozyten zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α , sowie zur Freisetzung von LTB₄ und anderen Arachidonsäuremetaboliten stimulierte (Kahlke, 1993).

Die Beobachtung, dass die leukozytenaktivierende Substanz ausschließlich in der Lipidphase der Dermatophytenextrakte lokalisiert war, lieferte erste Hinweise

auf die chemische Struktur (Kahlke *et al.*, 1996). Im weiteren Verlauf wurde die Substanz daher als LILA (lipidartiger Leukozytenaktivator oder lipid like leukocyte activator) bezeichnet. Mit Hilfe von *in vitro*-Systemen konnte eine chemotaktische Wirkung von LILA auf neutrophile Granulozyten und auf Monozyten nachgewiesen werden. Neutrophile Granulozyten reagierten auf den Stimulus mit der Bildung von toxischen Sauerstoffmetaboliten und mit der Freisetzung von Bestandteilen der azurophilen Granula wie β -Glukuronidase, Myeloperoxidase und Elastase. Da neutrophile Granulozyten den wichtigsten Zelltyp zur Abwehr von Pilzinfektionen darstellen, sprechen diese Daten für eine mögliche Beteiligung dieser Leukozytenaktivatoren an einer Rekrutierung von Granulozyten bei entzündlichen Dermatomykosen *in vivo*.

Zusätzlich konnte mittels Rezeptordeaktivierungsexperimenten gezeigt werden, dass LILA an keinen der bekannten Chemotaxinrezeptoren bindet, und somit möglicherweise einen eigenen Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten besitzt (Kahlke, 1993; Kahlke *et al.*, 1996).

Eine genauere biologische und chemische Charakterisierung von LILA erforderte den Zugang zu größeren Mengen von LILA. Die Möglichkeit für weitere Untersuchungen größere Mengen von LILA zu isolieren ergab sich durch die Beobachtung, dass auch die apathogene Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* diese lipidartigen Leukozytenaktivatoren enthält (Bülow, 1997). Um Daten über die chemische Struktur von LILA zu erhalten, wurden in früheren Untersuchungen von M. Bülow (1997) LILA-Präparationen aus *Saccharomyces cerevisiae* massenspektrometrisch und ^1H -kernspinresonanzspektroskopisch untersucht. In diesen Präparationen wurde 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin massenspektrometrisch nachgewiesen (Bülow, 1997). Phosphatidylcholin stellt bei den meisten Hefearten den Hauptanteil (20-25%) der Phospholipide (Kaneko *et al.*, 1975).

Da die ^1H NMR-Untersuchung dieses LILA keine Protonensignale von Cholin-Resten zeigten, handelt es sich hier um eine Verunreinigung der LILA-Proben durch Spuren von Lysophosphatidylcholin. Diese Vermutung wurde unterstützt durch den Befund, dass synthetisches 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin (Sigma-Chemie, Deisenhofen) keine biologische Aktivität zeigte. Nach den kernspinresonanzspektroskopischen Daten könnte M. Bülow ein Bis-oleoyl-LILA isoliert haben (Bülow, 1997).

4.1.1 Menschliche Granulozyten erkennen verschiedene LILAs

Untersuchungen zu den chemischen Eigenschaften von LILA ergaben, dass LILA durch die Umsetzung mit Diazomethan, einem Reagenz zur Veresterung von Carbonsäuren, inaktiviert werden kann, aber nicht, wie für Carbonsäuren erwartet, bei pH 8 eluierbar ist (Kahlke, 1993). Basierend auf diesen scheinbar vorhandenen Widersprüchen wurde ein Extraktionsverfahren bei höheren pH-Werten verwendet, um zu überprüfen, ob LILA vielleicht eine schwächere Säure als Carbonsäuren darstellt. In der Tat ließen sich LILAs bei pH 13 aus organischen Lösungen extrahieren. In einem ersten Chromatographieschritt konnten sechs, chemisch unterscheidbare Leukozytenaktivatoren nachgewiesen werden (Abbildung 3-1, Seite 30). Alle sechs nachgewiesenen LILAs zeigten eine Reihe chemischer und biologischer Gemeinsamkeiten: Die Löslichkeit bei pH 13, ein lecithinartiges Verhalten bei Gemischen aus organischen und wässrigen Lösungen und die Fähigkeit, neutrophile Granulozyten zur Freisetzung der Myeloperoxidase zu stimulieren.

Um die chemische Struktur von LILA klären zu können, mussten die Präparationen weitestgehend von Verunreinigungen befreit werden. Da die HPLC-

Fractionen Lysophosphatidylcholine sowie weitere Verunreinigungen enthielten (Bülow, 1997), wurden sie mit Hilfe eines zweiten Chromatographieschrittes weitergereinigt. Dieses Verfahren hatten Creer und Gross 1985 entwickelt, um verschiedene Lysophosphatidylcholine voneinander zu trennen. Eine weitere Möglichkeit, die Proben von Lysophosphatidylcholinen zu trennen, wurde ebenfalls verwendet: LILA-Präparationen wurden mit Phospholipase C beziehungsweise D inkubiert um die Lysophosphatidylcholine zu hydrolysieren. Die entstandenen Hydrolyseprodukte ließen sich anschließend chromatographisch abtrennen, da sie völlig andere Eigenschaften aufwiesen. Da LILA-Präparationen durch Behandlung mit Phospholipasen nicht inaktiviert wurden, war der Nachweis erbracht, dass LILAs keine Phospholipide darstellen.

Mit Hilfe dieser Methode konnten Präparationen gewonnen werden, die keine Lysophosphatidylcholine mehr enthielten. Insgesamt wurden acht verschiedene chemisch unterscheidbare lipidartige Leukozytenaktivatoren aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (LILA-1 bis LILA-8, die zugehörigen Chromatogramme sind in Tabelle 3-1, Seite 30 verzeichnet). Alle isolierten Faktoren stimulierten die Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten und zeigten ein charakteristisches „Tailing“ im Elutionsverhalten bei der Verwendung einer RP-18 HPLC-Säule (2. HPLC-Schritt, Tabelle 2-1, Seite 19). Eine Ausnahme bildet LILA-5, welches durch scharfe Peaks ohne Tailing gekennzeichnet ist (Abbildung 3-44, Seite 70). Es handelt sich bei LILA somit nicht um eine einzelne Substanz, sondern um eine Gruppe von Aktivatoren, die chemisch heterogen zu sein scheint.

Alle bislang daraufhin überprüften Pilzspezies enthielten lipidartige Leukozytenaktivatoren: *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* und *Trichophyton mentagrophytes* (Kahlke, 1989; Kahlke, 1993). Neben der apathogenen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten auch in der apathogenen Hefe *Pichia pastoris* lipidartige Leukozytenaktivatoren nachgewiesen werden (Abbildung 3-49, Seite 74).

Um zu überprüfen, ob es sich bei LILA um eine für Pilze spezifische Substanz handelt, wurde menschliches Blut und ein pflanzliches Lipidextrakt auf Leukozytenaktivatoren untersucht. In keiner der Quellen konnten Leukozytenaktivatoren nachgewiesen werden (3.18.1, Seite 72 und 3.18.2, Seite 73). LILA könnte somit eine für Pilze spezifische Substanz darstellen. Da die Immunreaktion des Wirtorganismus auf Pathogenassoziierten Molekülen (PAM) basiert (Janeway, Jr., 1992), wäre es möglich, dass es sich bei LILA ebenfalls um ein exogenes und erregerspezifisches Signal und somit um ein PAM handelt, das von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und epidermalen Zellen (4.5) erkannt wird.

4.1.2 LILA gehört zu einer bisher unbekanntem Substanzklasse

Die biologische Aktivität von LILA-Präparationen konnte weder durch Inkubation mit Phospholipase C noch durch Inkubation mit Phospholipase D (Typ VI) deaktiviert werden (3.2, Seite 31). Dies bedeutet, dass LILA möglicherweise weder Lysophosphatidylcholin noch ein anderes Phospholipid ist (beide Substanzen dienen Phospholipasen als Substrat). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass synthetisches 1-Oleoyl-Lysophosphatidylcholin keine leukozytenaktivierende Wirkung aufweist (Bülow, 1997).

Eine Analyse der ¹H-NMR-Spektren von LILA-1 und LILA-2 zeigte, dass Signale vorhanden sind, die mit Palmitoleoyl- bzw. Linolylresten in den jeweiligen LILAs vereinbar sind. Diese Hypothese wird durch Hydrolyse-Experimente bestätigt, die zeigen, dass bei LILA-1 Palmitoleinsäure bzw. Linolsäure bei LILA-2 entsteht. Das Signal der Fettsäure wurde auch massenspektrometrisch nachgewie-

sen (Abbildung 3-14). Durch Verlust dieser Fettsäure ergibt sich ein Fragment von $547-254 = 293$, welches auch ein massenspektrometrisches Signal lieferte (Abbildung 3-14).

Da LILAs durch Lagerung in Methanol in den jeweiligen Fettsäuremethylester und ein weiteres, im Umkehrphasen-HPLC-System früher eluierendes Lipid zerfallen, das wiederum durch Methanolyse den Fettsäuremethylester bildet, scheinen LILA-1 und LILA-2 zwei identische Fettsäurereste zu enthalten. Diese Vermutung wird durch den Befund unterstützt, dass die Massenspektren von LILA-1 und LILA-2 Molekülmassen aufweisen, die sich durch die doppelte Differenz der Molekülmassen von Palmitoleinsäure und Linolsäure ($280-254=26$; $2 \times 26=52$) auszeichnen.

Da die 600 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektren keinerlei Zeichen einer Aufspaltung der ^1H -Signale der beiden Acylreste aufweisen, müssen beide Acylreste symmetrisch substituiert sein. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind keine weitere Protonen nachweisbar, so scheint die offensichtlich beiden LILAs gemeinsame Kerngruppe keine Protonen zu enthalten oder diese weisen eine so hohe Azidität auf, dass die Signale möglicherweise verbreitert und damit nicht sichtbar sind. Derartige Signalverbreiterungen sind für Protonen bekannt, die Brückenbindungen zu Carbonylgruppen zeigen. Da beide LILAs bei pH 13 in wässrigen Phasen gelöst werden, muss es sich um sehr schwache Säuren handeln.

Aufgrund der massenspektrometrischen Daten scheint die bislang unbekannte „Kerngruppe“ der LILAs die Elementarzusammensetzung $\text{CH}_2\text{N}_2\text{O}$ (Masse: 58) zu besitzen, da nur diese eine symmetrische Substitution mit Acylresten zulässt (Abbildung 4-1).

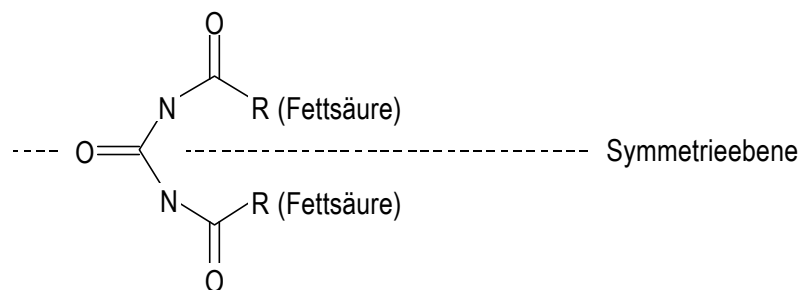


Abbildung 4-1: Strukturhypothese und gemeinsames Strukturelement: Die Kerngruppe von lipidartigen Leukozytenaktivatoren.

Die kalkulierten Molekularmassen der beiden LILAs würden demnach 532 (für LILA-1) bzw. 584 (für LILA-2) betragen. Die bei $m/z = 533$ bzw. 585 gefundenen Molekülmassen, die einfach protonierten Formen (MH^+) darstellen, wären mit dieser Hypothese im Einklang.

Die unter bestimmten Bedingungen (ESI-MS-Analysen in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$; Cone-Voltage: 60V) zusätzlich gefundenen Molekülmassen bei 547 bzw. 599, also 14 Masseeinheiten höher als der errechnete Wert der jeweiligen Molekülmassen, scheinen von einem Methylierungsprodukt der LILAs herzurühren. Diese scheinen nur bei der ESI-MS-Analyse vorhanden zu sein, da zusätzliche Methyl-Signale in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren fehlen. Da es möglich ist, dass Bis-acyl-substituierte Harnstoffe leicht O-methyliert werden, und entsprechende O-Methyl-

Derivate bilden, könnte dies das Auftreten der um 14 Masseinheiten höheren Molekularmassen erklären. Die protonierten Formen dieses Methylierungsproduktes von Bis-acyl-harnstoffen verlieren das entsprechende Säureamid während der MS-Analyse (Massen der Säureamide: 253 bzw. 279). Die beobachteten Massen bei $m/z = 253$ (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-14) sowie bei $m/z = 279$ (Abbildung 3-16) könnten somit die Hypothese der Methylierung stützen.

Manchmal in MS-Spektren auftretende Massen, die jeweils um 16 bzw. 32 Masseinheiten höhere Massen als Massen der Fragmente aufweisen, scheinen von Oxidationsprodukten der Fettsäuren (Hydroperoxide mit einem Massezuwachs um jeweils 32 Masseinheiten bzw. Epoxide mit einem Massezuwachs um jeweils 16 Masseinheiten) herzurühren (LILA-1: Abbildung 3-15, Massen bei $m/z = 293, 309, 325$; LILA-2: Abbildung 3-16, Massen bei $m/z = 319, 335, 351, 367$)

Eine ursprünglich aufgestellte Hypothese der Existenz eines Harnstoffoxims, das ebenfalls um 15 höhere Molekularmassen zeigen müsste, wurde verworfen, da a) durch die Einführung einer Oximgruppierung eine Asymmetrie eingeführt würde, die in 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sichtbar sein sollte und b) eine gezielte Suche nach Hydroxylamin nach LILA-Hydrolyse negativ verlaufen war.

Demnach scheint es sich bei LILA-1 um Bis-palmitoleoyl-harnstoff (Abbildung 4-2) und bei LILA-2 um Bis-linolyol-harnstoff (Abbildung 4-3) zu handeln. Aufgrund der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Hydrolyse-Reaktion scheint M. Bülow primär den Bis-oleoyl-harnstoff isoliert zu haben (Bülow, 1997).

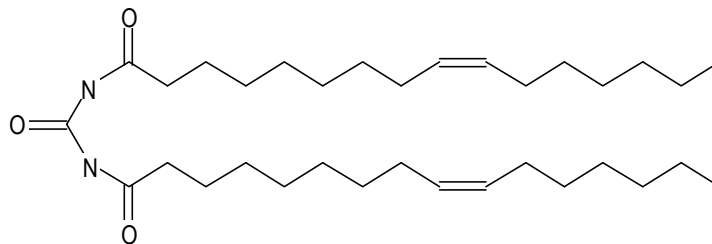


Abbildung 4-2: Struktur des Bis-palmitoleoyl-harnstoffes. $\text{C}_{33}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_3$ MW = 532 (entspricht LILA-1)

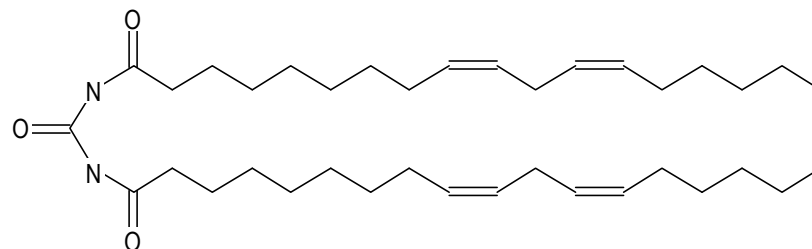


Abbildung 4-3: Struktur des Bis-linolyol-harnstoffes. $\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_3$, MW = 584 (entspricht LILA-2)

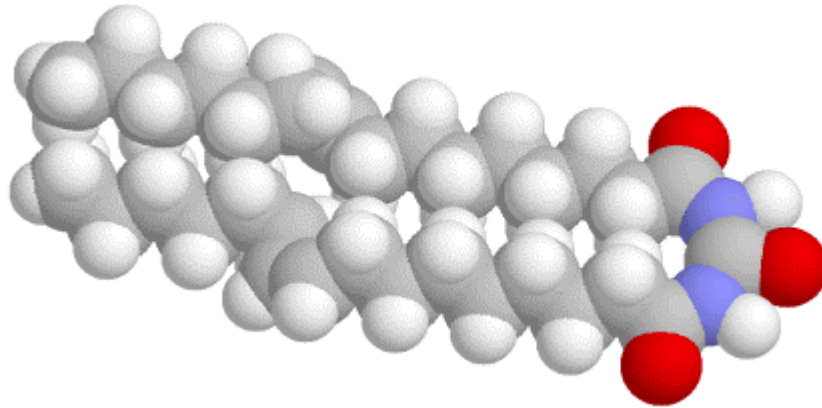


Abbildung 4-4: Kalottenmodell eines LILA-2 Moleküls (Bis-linolyl-harnstoff). Erstellt wurde das Modell mit dem 3D Modul aus ISIS-Draw 2.2, die räumliche Darstellung wurde mittels RasWin Molecular Graphics 2.5 errechnet.

Um die Strukturhypothese zu belegen, wurde versucht, unter Verwendung von Standardbedingungen Harnstoff mit den jeweiligen Fettsäurechloriden zu acylieren. In der Tat konnten biologisch aktive Produkte erhalten werden, die nach physikochemischen Kriterien mit den jeweiligen natürlicher LILAs übereinstimmten. Diese synthetischen Produkte wiesen auch gleichartige Eigenschaften hinsichtlich Stabilität und Empfindlichkeit gegenüber Methanol auf, somit erscheint es als hinreichend gesichert, dass die postulierte LILA-Struktur korrekt ist (genauere Aufstellung unter 3.15, Seite 60). Da bei der chemischen Synthese von bis-substituierten Harnstoffen auch unsymmetrisch substituierte Derivate entstehen können (über N- und O-Acylierung), die ähnliche Eigenschaften wie die symmetrisch substituierten Harnstoffe aufweisen sollten, erfolgte die Synthese unter Bedingungen (durch Zugabe einer tertiären Base wie Triethylamin oder Pyridin), die die Umlagerung von O-Acyl-Derivaten in N-Acyl-Derivate begünstigten. Trotzdem wurden auch Produkte isoliert, die ähnliche Massenspektren wie die LILAs aufwiesen, aber biologisch nicht aktiv waren bzw. zum Teil lytische Eigenschaften aufwiesen.

Die Beilstein-Datenbank enthielt keine Strukturen, die mit LILA vergleichbar gewesen wären (3.2.1, Seite 31). Es liegen in der Literatur keine Hinweise auf die Existenz von Bis-acyl-harnstoff-strukturen in der Natur vor (Stand: März 2001). Derartige Substanzen wurden bislang noch nicht aus lebenden Organismen isoliert. Es handelt sich bei LILA demnach sowohl um ein chemisch neues, als auch um ein biologisch neues Prinzip. Da neben pathogenen Hefen wie *Candida albicans* und Dermatophyten auch apathogene Hefen wie *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae* LILA produzieren, ist LILA kein zwingender Pathogenitätsfaktor.

4.1.3 LILA als mögliches Produkt der Lipidumwandlung in Pilzen

Die Synthese leukotaktischer Lipide durch Hefen ist vermutlich eng an den Lipidstoffwechsel der Pilze gebunden. Die Lipidzusammensetzung einer *Candida*-Kultur verändert sich während des Wachstums kontinuierlich, wobei die Synthese spezifischer Lipid-Peroxidasen Einfluss auf die Lipide der Zellen nimmt. Der nachweisbare Anteil an Linolsäure sinkt in einer Kultur gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase (log-Phase) (Ratray *et al.*, 1975). Phosphatidylcholin stellt bei den meisten Hefearten den Hauptanteil (20-25%) der Phospholipide dar. Lysophosphatidylcholine kommen nur zu einem geringeren Anteil vor, und sind überwiegend das Produkt von Hydrolysen, die nach der Präparation auftreten. C_{16:1}-Fettsäuren sind in *Saccharomyces*-Arten sehr häufig (16-51%), C_{18:2}-Fettsäuren konnten ebenfalls in Anteilen von 0-34% (je nach Spezies) nachgewiesen werden (Kaneko *et al.*, 1975). Untersuchungen an *Candida*-Kulturen zeigten, dass die maximale LILA-Produktion insbesondere während Ende der log-Phase auftritt (Kahlke, 1993). Da in dieser Phase ein Grossteil der Glykolipide und Phospholipide verstoffwechselt werden (Mishra und Prasad, 1990), ist es möglich, dass LILA ein Produkt dieser Lipidumwandlung innerhalb der Hefe repräsentiert. LILA wird überwiegend in der Hefeform von *Candida albicans* gebildet und ist in der Mycelform nur in geringen Mengen nachzuweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass LILA in Kulturen mit erhöhtem Glucoseangebot vermehrt gebildet wird (Kahlke, 1993). Genauere Aussagen über die Biosynthese von LILA lassen jedoch die zur Verfügung stehenden Daten noch nicht zu.

Im Rahmen dieser Arbeit standen die Untersuchungen an den Leukozytenaktivatoren Bis-palmitoleoyl-harnstoff und Bis-linoly-l-harnstoff im Mittelpunkt. Da *Saccharomyces cerevisiae* neben LILA-1 und LILA-2 noch eine Reihe weiterer Leukozytenaktivatoren enthält (3.1, Seite 29), ist es möglich, dass diese Faktoren strukturell und biologisch der selben Stoffgruppe angehören. Die Synthese von LILA-ähnlichen Strukturen, die Pilzen bislang noch nicht nachgewiesen wurden, sowie die Synthese von LILAs mit zwei verschiedenen Fettsäureresten ist ebenfalls möglich. Bei LILA handelt es sich somit nicht um ein einzelnes Chemotaxin, sondern um eine „LILA-Familie“, deren Mitglieder sich vermutlich nur durch veränderte Fettsäurereste bei gleichbleibender Kerngruppe, und somit auch veränderter biologische Bedeutungen unterscheiden.

4.2 Neutrophile Granulozyten reagieren dosisabhängig auf LILA-Stimulation

Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der biologischen Antwort ergaben, dass Bis-palmitoleoyl-harnstoff eine konzentrationsabhängige Reaktion der neutrophilen Granulozyten auslöst (nachgewiesen für die Freisetzung der Myeloperoxidase, für den Ca²⁺-Einstrom in die Zelle und für die Chemotaxis). Die sigmoidale Form der Dosis-Wirkungskurve spricht für ein rezeptorvermitteltes Signal (Abbildung 3-31, Seite 56). Weitere Hinweise auf das Vorhandensein eines Rezeptors lieferten die Untersuchungen zur Signaltransduktion (ab 4.3, Seite 86). Die in Abbildung 3-32 (Seite 57) dargestellten Dosis-Wirkungskurven von natürlichem LILA-1 und synthetischem Bis-palmitoleoyl-harnstoff deuten auf eine chemische und biologische Übereinstimmung beider Leukozytenaktivatoren hin. Eine Gegenüberstellung der Eigenschaften von natürlichen und synthetische LILAs ist in Tabelle 3-5 (Seite 68) aufgeführt.

4.3 Der Signaltransduktionsweg von LILA in neutrophilen Granulozyten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten erste Daten über den Signaltransduktionsweg von LILA gesammelt werden. Hierzu dienten vor allem Messungen der Ca^{2+} -Mobilisierung mit synthetischem LILA (2.8.4, Seite 22). Kalzium wirkt als ein nahezu universeller Botenstoff um Signale, die auf der Oberfläche der Zelle ankommen, ins Zellinnere weiterzuleiten. Neben Ca^{2+} spielen auch K^+ , Na^+ , Cl^- und Mg^{2+} eine wichtige Rolle, wobei diese für die Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen entweder nicht genug Ladungen tragen, zu klein oder zu groß sind. Aus diesem Grunde wurde zur Untersuchung der durch LILA vermittelten Signale die Messung des Ca^{2+} -Einstromes gewählt. Hierbei wurde der Ca^{2+} -Einstrom mittels Fura-2/AM gemessen (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Der erste Schritt der Signaltransduktion besteht in der Bindung des Liganden an den Rezeptor. Ergebnisse aus Rezeptordeaktivierungsexperimenten mit bekannten Chemotaxinen sprechen für das Vorhandensein eines spezifischen LILA-Rezeptors (Kahlke, 1993). LILA zeigte keine Kreuzreaktivitäten mit 5-oxo-Eicosatetraensäure, C5a, FMLP, IL-8, LTB_4 und PAF (Bülow *et al.*, 1996).

Erste Hinweise auf eine Beteiligung von G-Proteinen bei der LILA-abhängigen PMN-Aktivierung lieferten die Daten aus vorausgegangenen Arbeiten (Bülow, 1997). Die Spezifität eines G-Protein gekoppelten Rezeptors für ein bestimmtes G-Protein wird durch seine zytoplasmatische Region determiniert (Wong und Ross, 1994). Durch die Deaktivierung mit Pertussis-Toxin wurde im Rahmen der Untersuchungen zur LILA-Signaltransduktion experimentell eine inhibitorische α -Untereinheit (α_i) nachgewiesen (3.15.2, Seite 62). Diese Untereinheit ist Pertussistoxin-sensitiv (Clapham, 1995) und an Prozessen der Signaltransduktion bei chemotaktischen Antworten beteiligt. Hierzu gehört beispielsweise auch die Weiterleitung der Signale von IL-8, FMLP oder LTB_4 . Einzige Ausnahme bildet hierbei PAF, dessen Signalweiterleitung über ein Pertussistoxin-resistentes System vermittelt wird (Becker *et al.*, 1986; Ali *et al.*, 1994; Baggiolini *et al.*, 1997). Die inhibitorische α -Untereinheit bindet und hydrolysiert GTP und inhibiert die Adenylatcyclase.

α -Untereinheiten besitzen keine Transmembrandomäne und werden stattdessen mittels einer Fettsäure in der Membran verankert (Spiegel *et al.*, 1991). Hierzu wird das G-Protein von der N-Myristoyl-Transferase (NMT) myristoyliert. Ohne diese Myristoylierung erfolgt praktisch keine Signalweiterleitung (Shaw *et al.*, 1990). Eine Inhibition der NMT konnte experimentell mit einem Substratanalogen erreicht werden, eine anschließende Stimulation mit LILA führte zu keinem Ca^{2+} -Einstrom (3.15.5, Seite 65). Diese Daten werden durch die Ergebnisse des Pertussistoxin-Experiments gestützt: Stimulatorische α -Untereinheiten (α_s) werden nicht myristoyliert und sind auch nicht durch Pertussis-Toxin hemmbar. Die Untereinheiten α_0 , α_i , und α_2 können ohne eine Myristoylierung nicht korrekt in der Membran verankert werden und können somit auch nicht an die $\beta\gamma$ -Untereinheiten binden (Casey, 1994).

Die Beobachtung, dass LILA ein eigenes Übertragungspotential für Acylreste besitzt (3.7, Seite 49), führte zu der Überlegung, dass LILA möglicherweise auch nichtenzymatisch die α_i -Untereinheiten der G-Proteine acyliert, und damit einen Membrananker einführt. Durch die Deaktivierung des LILA-Signals mittels eines Hemmstoffes der Myristoyltransferase war es nicht möglich, diese Vermutung zu bestätigen. Vielmehr konnten die Daten in der Weise interpretiert werden, dass LILA in diesem System offensichtlich keine Acylierungsfunktionen übernimmt.

Bevor ein G-Protein in der Membran verankert wird, unterliegt es einer Reihe posttranslationaler Veränderungen wie der Methylesterbildung am carboxyterminalen Prenylcystein-Rest. Das hierfür verantwortliche Enzym ist die membranassoziierte Carboxylmethyltransferase (Philips *et al.*, 1993). Ein Substratanalogon dieser Transferase hemmte die LILA-Signaltransduktion vollständig (3.15.4, Seite 64). Unterstützt werden diese Daten durch frühere Beobachtungen an natürlichem LILA (Bülow, 1997).

Der nächste Schritt in der Signaltransduktion ist die Aktivierung der membranständigen Phospholipase C. Pertussistoxin-sensitive G-Proteine (mit den Untereinheiten α_i oder α_0) aktivieren die Phospholipase C β (Sternweis und Smrcka, 1992). Pertussistoxin-insensitive G-Proteine aktivieren die Phospholipase C β ausschließlich über eine α_q -Untereinheit. Zudem kann die Phospholipase C β (PLC β) auch durch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des Pertussistoxin-sensitiven G-Proteins aktiviert werden (Neer, 1995). Die aktivierte Phospholipase spaltet Phosphatidylinositol in Diacylglycerol und lösliches Inositol-(1,4,5)Trisphosphat. Durch Inhibition der Phospholipase C mit PMA wurde das LILA-vermittelte Signal vollständig deaktiviert (3.15.3, Seite 63). Diese Daten stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen zur Abhängigkeit des LILA-Signals von der Phospholipase C (Bülow, 1997).

Das Inositol-(1,4,5)Trisphosphat aktiviert intrazelluläre Kalziumspeicherkompartimente, welche über ihre Kanäle innerhalb von Sekunden das Ca^{2+} freisetzen. Auch Pertussistoxin-sensitive G-Proteine führen zu einer Ca^{2+} -Freisetzung (Moriarty *et al.*, 1990). Unter physiologischen Bedingungen liegt die zytosmatische Ca^{2+} -Konzentration neutrophiler Granulozyten bei 50-100 nM und außerhalb der Zellen bei ca. 2 mM, Mitochondrien enthalten bis 0,5 mM Ca^{2+} (Clapham, 1995). In den aus frischem Vollblut isolierten neutrophilen Granulozyten wurde intrazellulär 50 nM Ca^{2+} gemessen und extrazellulär eine Konzentration von 1 mM eingestellt. Die Granulozyten reagierten innerhalb von 3-10 Sekunden mit einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration von 50 nM auf 150 nM. Nach etwa 30 Sekunden stellte sich die Ca^{2+} -Ausgangskonzentration in der Zelle wieder ein (ab 3.15, Seite 60). Neutrophile Granulozyten besitzen zwei intrazelluläre Speicherkompartimente, aus denen das Ca^{2+} stammen könnte: Endoplasmatisches Retikulum (ER) und Mitochondrien, wobei die Freisetzung aus dem ER durch Inositol-(1,4,5)Trisphosphat abhängige Kalziumkanäle reguliert wird (Alessi *et al.*, 1995; Coffey *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Zugabe von EGTA in das extrazelluläre Medium der LILA-induzierte Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen nur vermindert, nicht aber blockiert werden. Dies bedeutet, dass LILA sowohl den Einstrom aus dem extrazellulären Medium als auch aus intrazellulären Speicherkompartimenten bewirkt.

Die im Rahmen der Untersuchungen zur LILA-Signaltransduktion identifizierten Elemente sind auch charakteristisch für die bislang identifizierten Neutrophilen-Chemotaxine. Chemotaxine wie FMLP (Pozzan *et al.*, 1983), PAF oder LTB_4 (Merritt *et al.*, 1989) führen zu einem schnellen und kurzzeitigen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dieser Anstieg ist mit einem initialen Einstrom von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern und einem nachfolgenden Einstrom von Kalziumionen aus dem extrazellulären Raum verbunden (Andersson *et al.*, 1986). Chemotaxine wie FMLP oder IL-8 verursachen dabei eine rezeptorvermittelte Aktivierung von G_i -Proteinen, welche die Phospholipase C aktivieren.

Die nach der LILA-Stimulation freigesetzten Ca^{2+} -Ionen können in ihrer Funktion als „Second Messenger“ durch Aktivierung verschiedener Vorgänge innerhalb der neutrophilen Granulozyten im Rahmen von entzündlichen Prozessen

eine wichtige Rolle spielen: Dazu gehören die Regulierung der Chemotaxis von Leukozyten sowie deren Fähigkeit zur Phagozytose von Partikeln oder Mikroorganismen, die den Entzündungsprozess ausgelöst haben. Ein direkter Effekt des Anstiegs der intrazellulären Kalziumionenkonzentration auf den Prozess der Chemotaxis könnte die Fragmentierung und damit der Zerfall des Actinzytoskeletts durch kalziumregulierte Moleküle wie Gelsolin (Cunningham *et al.*, 1991), MARCKS (Hartwig *et al.*, 1992) oder Fodrin (Harris und Morrow, 1990) sein. Unterstützt werden diese Beobachtungen von Untersuchungen, die zeigten, dass die Polymerisation von Actin kalziumunabhängig ist (Lepidi *et al.*, 1995). Zudem regulieren Ca^{2+} -Ionen die Affinität von Integrinen gegenüber Proteinen der extrazellulären Matrix: der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wie nach einer Stimulation mit LILA, kann zu einer verminderten Affinität von Integrinen an Fibronectin und Vitronectin führen. Dies wurde bereits für die Stimulation mit anderen Chemotaxinen gezeigt (Hendey *et al.*, 1992). Dieser Vorgang der Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel ist Voraussetzung, bevor eine chemotaktische Wanderung entlang eines Gradienten erfolgen kann. Die Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit LILA-Präparationen führte zu einer signifikanten Adhärenzsteigerung (Kahlke, 1993), und unterstreicht die mögliche Bedeutung von LILA für die Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsherd.

Die Phagozytose von Erregermaterial wie Pilzhyphen in der Haut ist ebenfalls ein Ca^{2+} -abhängiger Prozess: Die Fusion sekundärer Granula mit Phagosomen wird durch Kalziumionen reguliert (Jaconi *et al.*, 1990). Die Kalziumionen führen möglicherweise dabei durch eine direkte Interaktion mit den negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembranen zu einer Fusion von intrazellulären Vesikeln (Walter *et al.*, 1986; Ohki und Duax, 1986). Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung dieser Prozesse durch Kalziumionen wäre eine kalziumabhängige Regulation von Proteinen, welche die Fusion intrazellulärer Vesikel vermitteln (Meers *et al.*, 1987)

Ein postuliertes Modell für die Signalweiterleitung nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit LILA ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

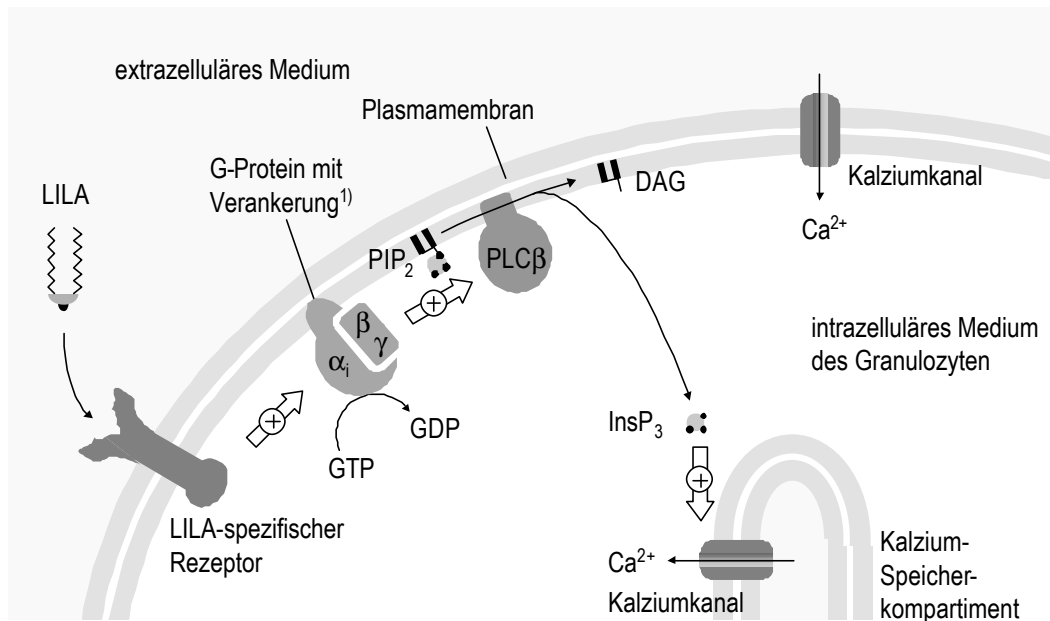


Abbildung 4-5: Postuliertes Modell des Signaltransduktionsweges von LILA in neutrophilen Granulozyten. Die Abbildung zeigt die experimentell identifizierten Elemente: Ein LILA-Stimulus koppelt an einen postulierten LILA-Rezeptor. Dieser aktiviert ein inhibitorisches G-Protein, dessen α_i -Untereinheiten aktivieren die membranständige Phospholipase C β , welche wiederum PIP₂ in DAG und InsP₃ spaltet. InsP₃ aktiviert Kalziumkanäle und die Ca²⁺-Konzentration in der Zelle erhöht sich kurzzeitig von 50 auf 200 nM (Dauer ca. 30 s). Die Konzentrationsänderung führt zur Aktivierung der Zelle und löst kalziumabhängige Vorgänge aus.

¹⁾ Die Verankerung der α_i -Untereinheit des G-Proteins wird durch Myristoylierung des Proteins ermöglicht.

Abkürzungen: (+) = Stimulation, DAG = Diacylglycerol, GDP = Guanosindiphosphat, GTP = Guanosintriphosphat, InsP₃ = Inositol(1,4,5)Trisphosphat, PIP₂ = Phosphatidylinositol (4,5)bisphosphat, PLC = Phospholipase C,

4.4 Die evolutorische Stellung des LILA-Erkennungsmechanismus

Die Koexistenz von Wirt und Mikroorganismen ist oft von gegenseitigem Nutzen. Im Falle einer Konkurrenz hatten beide Seiten im Verlauf der Evolution genügend Zeit, Verteidigungs- und Abwehrstrategien zu entwickeln (Gabay, 1994).

Nur tierische Vielzeller sind in der Lage, sich ein energieaufwendiges Abwehrsystem zu leisten (beispielsweise beim Menschen die Produktion von $5 \cdot 10^9$ Zellen aus dem Knochenmark pro Tag). Von den Fischen bis zu den Säugern zeigt sich ein stufenweiser Anstieg der Komplexität von genetischen Mechanismen, Zellpopulationen und Zellarchitekturen des Immunsystems. Das Immunsystem entwickelte sich jedoch nicht, um körperfremde von körpereigenen Elementen zu unterscheiden – dieses Problem musste bereits viel früher in der Evolution gelöst werden (Quintans, 1994).

Für den Wirtsorganismus ist es von zentraler Bedeutung, die Mikroorganismen rechtzeitig zu erkennen. Jedes pathogenspezifische Element (PAM = pathogen pattern associated molecule) kann hierbei als Ziel dienen: Pathogenspezifische RNA, DNA, Proteine, Lipide, Zucker und Mischsubstanzen wie beispielsweise Glykolipide oder Glykoproteine aus Mikroorganismen haben die Funktionen von pathogenassoziierten Molekülen. LILA konnte in allen bislang untersuchten Pilzspezies nachgewiesen werden, wohingegen menschliches Blut und ein Lipidextrakt pflanzlichen Ursprungs keine lipidartigen Leukozytenaktivatoren enthielten (3.18.1, 3.18.2). Bei LILA handelt es sich um ein offensichtlich pilzspezifisches PAM, das von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Eosinophilen sowie Epithelzellen wie Hautkeratinozyten erkannt wird (Kahlke, 1993).

Rezeptoren, die bestimmte Pathogenmuster binden, sind die ersten Erkennungssysteme, die sich in der Evolution entwickelt haben. Sie dienen dazu, auf ein möglichst breites Spektrum an Keimen zu reagieren (Janeway, Jr., 1992). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Hinweise auf die Existenz eines LILA-Rezeptors auf neutrophilen Granulozyten erhalten (ab 3.15, Seite 60). Rezeptor-deaktivierungsexperimente mit bekannten Chemotaxinen und LILA zeigten, dass sich der postulierte LILA-Rezeptor nicht mit den bekannten Chemotaxinen deaktivieren lässt (Kahlke, 1993; Bülow *et al.*, 1996). LILA könnte demnach einen spezifischen Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten besitzen.

Da es sich hierbei um evolutorisch sehr alte Prinzipien handelt, findet man auch bei Pflanzen vergleichbare Mechanismen: Zellwandkomponenten aus *Phytophthora infestans* und apathogenen *Phytophthora*-spezies lösen in pflanzlichen Modellsystemen Abwehrreaktionen aus (Doke *et al.*, 1979). Hierbei übernehmen sogenannte Elizitoren die Rolle des Pathogenmuster-assoziierten Moleküls (Scheel und Parker, 1990). Die Abwehrreaktionen pflanzlicher Epithelzellen basieren auf der O_2^- - und H_2O_2 -Produktion, Proteasen und antimikrobiellen Peptiden und sind damit den Abwehrreaktionen der neutrophilen Granulozyten in Säugern sehr ähnlich (Terras *et al.*, 1993; Doke *et al.*, 1996; Broekaert *et al.*, 1997). An *Drosophila* wurde gezeigt, dass der systemische Kontakt mit Pilzen die Expression von Drosomycin, einem fungiziden antimikrobiellen Peptid, auslöst. Hierbei übernimmt die Proteinkaskade Spätzle/Toll/Cactus regulatorische Funktionen. Die Gene zeigen strukturelle Verwandtschaft mit dem in Säugern vorkommenden IL-1/I- κ B/NF- κ B-Motiv (Fehlbaum *et al.*, 1994). Es ist durchaus denkbar, dass neben dem Menschen auch Insekten und Pflanzen ein Rezeptorsystem für Moleküle aus der LILA-Familie besitzen. Die exogenen Substanzen, die in Insekten und Pflanzen diese Abwehrantworten auslösen, sind weitestgehend

unbekannt (in der Phytopathologie werden sowohl endogene als auch exogene Mediatoren als Elizitoren bezeichnet).

Nach bisherigem Kenntnisstand scheint es sich bei LILA um eine pilzspezifische Substanz zu handeln, die vom Wirtsorganismus als erregerspezifisch erkannt wird. Die Tatsache, dass Pilze im Laufe der Evolution nicht in der Lage waren, LILA gegen eine Substanz auszutauschen, die vom Wirtsorganismus nicht erkannt wird, spricht dafür, dass LILA möglicherweise eine für Pilze essentielle Substanz ist, die nicht ersetzt werden kann.

4.5 Die Bedeutung des LILA-Systems für die menschliche Immunabwehr

Neutrophile Granulozyten repräsentieren die wichtigste Verteidigungsfront der menschlichen Haut gegen Pilzinfektionen (Rogers und Balish, 1980). Bei der Aktivierung und Rekrutierung dieser Zellen spielen endogene Entzündungsmediatoren wie C5a, IFN- γ , IL-8, LTB₄, PAF und TNF- α eine entscheidende Rolle. Neben diesen endogenen Mediatoren muss das menschliche Abwehrsystem auch in der Lage sein, exogene Substanzen zu erkennen. Eine schnelle, nicht komplementvermittelte und somit direkte Aktivierung von Abwehrzellen ist bereits für das bakterielle Peptid FMLP bekannt (Schiffmann *et al.*, 1975). Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte exogene Leukozytenaktivator aus Pilzen stellt in seiner Funktion einen dem bakteriellen FMLP vergleichbaren Mediator dar. LILA kann von neutrophilen Granulozyten direkt erkannt werden und initiiert über rezeptorvermittelte Prozesse eine Abwehrreaktion. Die Erkennung solcher pathogenmuster-assoziierten Moleküle ist der erste Schritt in der Kaskade der Verteidigungsmechanismen (Janeway, Jr., 1992).

Um die Bedeutung von LILA für die epitheliale Abwehr zu untersuchen, wurden Keratinozytenzelllinien mit LILA stimuliert: Es konnte nachgewiesen werden, dass LILA die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , der Chemokine IL-8, IP-10, MCP-1 und RANTES sowie IL-8 Rezeptor B stimuliert (Bülow, 1997). In Zellkulturen dermalen Fibroblasten wurde nach LILA-Stimulation die Genexpression der Zytokine IL-1 α , IL-1 β sowie der Chemokine IP-10 und MCP-1 beobachtet (Bülow, 1997).

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion müssen die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten an den Infektionsherd gelangen. Eine Voraussetzung hierfür ist die Adhäsion der Granulozyten an das Gefäßendothel. Dieser Vorgang der Adhäsion wurde auch bei LILA-stimulierten Granulozyten beobachtet (Kahlke, 1993). LILA könnte somit eine entscheidende Funktion in der Initialphase der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ausüben. Nach der Adhäsion an das Gefäßendothel wandern die neutrophilen Granulozyten durch die Endothelzellenbarriere (Diapedese) chemotaktisch an den Entzündungsort. Ein Netzwerk aus unterschiedlichen Entzündungsmediatoren vermittelt die Regulation und Steuerung dieser Prozesse. Dabei werden sowohl endogene als auch exogene Faktoren aus unterschiedlichen Zelltypen und eingewanderten Mikroorganismen freigesetzt (Johnson *et al.*, 1992). Zu diesen exogenen Faktoren gehört das Chemotaxin FMLP, das beispielsweise die mRNA-Expression sowie die Sekretion von IL-8 in neutrophilen Granulozyten stimulieren kann (Strieter *et al.*, 1991; Cassatella *et al.*, 1992).

Bei der Initialisierung einer kutanen Entzündungsreaktion schreibt man IL-1 α , einem primären Zytokin, eine entscheidende Rolle zu. In der Epidermis stammt IL-1 α vor allem aus Keratinozyten (Kupper, 1988). Keratinozyten können durch Stimulation mit IL-1 α , IL 1 β , TNF- α und GM-CSF zur IL-1 α mRNA-Expression stimuliert werden (Ansel *et al.*, 1990). LILA stellt ebenfalls einen Stimulus für die

IL-1 α mRNA-Expression dar (Bülow, 1997). Daneben ist es auch möglich, dass die IL-1 α mRNA Expression nicht nur durch LILA, sondern auch durch andere biologisch aktive Zytokine oder in autokriner Weise durch IL-1 α selbst verursacht wird (Ansel *et al.*, 1990). Die IL-1 α mRNA Expression durch LILA-Stimulation deutet darauf hin, dass LILA möglicherweise an Prozessen in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion beteiligt ist.

Die in Keratinozyten nachgewiesene, durch LILA induzierte IL-1 β mRNA-Expression (Bülow, 1997) spielt möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle, da Keratinozyten keine IL-1-Konvertase enthalten, welche die inaktive pro-IL-1 β Form in das aktive Molekül umwandelt (Mizutani *et al.*, 1991).

IL-8 gehört zu der Gruppe der chemotaktischen, proinflammatorischen Zytokine, die durch das gemeinsame strukturelle Motiv von vier Cysteinen an gleicher relativer Position gekennzeichnet sind, die zwei Disulfidbrücken bilden. Die ersten beiden Cysteine sind durch eine Aminosäure getrennt, man bezeichnet sie daher als C-X-C-Chemokine (Matsushima und Oppenheim, 1989). IL-8 wirkt stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Schröder *et al.*, 1988) und T-Lymphozyten (Larsen *et al.*, 1989). Zudem stimuliert es die Proliferation von Keratinozyten (Tuschil *et al.*, 1992). Die IL-8-Expression in Keratinozyten kann durch Stimulation mit IL-1 α oder TNF α aktiviert werden, wobei IL-1 α der wesentlich stärkere Stimulus ist (Larsen *et al.*, 1989). In Keratinozyten wurde eine LILA-induzierte IL-8 Expression sowohl auf mRNA-Ebene (Bülow, 1997) als auch auf Proteinebene gezeigt (Kahlke, 1993). Diese Daten stehen im Einklang mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten IL-8 mRNA-Expression nach Stimulation mit synthetischen Bis-acyl-harnstoffen (3.14, Seite 59). Da IL-8 während einer Entzündungsreaktion von dermalen Zellen wie Keratinozyten, dermalen Fibroblasten und Endothelzellen abgegeben wird, und neutrophile Granulozyten in pilzinfiziertes Gewebe einströmen (Dahl, 1987), ist es denkbar, dass eine LILA-induzierte IL-8-Produktion als weiteres Signal zur Rekrutierung von Neutrophilen bei entzündlichen Dermatomykosen von entscheidender Bedeutung ist.

IP-10, das an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist und primär ein Chemotaxin für Lymphozyten darstellt, gehört ebenfalls zur Gruppe der C-X-C-Chemokine (Luster und Ravetch, 1987). Neben Endothelzellen gehören Keratinozyten zu den Hauptproduzenten von IP-10 (Krueger *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu reagieren neutrophile Granulozyten nicht auf den IP-10-Stimulus (Dewald *et al.*, 1992). Eine Stimulation von HaCat-Zellen mit LILA führte zu einem deutlichen Anstieg der IP-10 mRNA-Expression nach 24 Stunden (Bülow, 1997). Da T-Lymphozyten bei Pilzinfektionen aktiviert werden, könnte dies bedeuten, dass die LILA-induzierte IP-10 Expression für deren Aktivierung mitverantwortlich ist. Die transepidermale Chemotaxis von T-Lymphozyten ist jedoch *in vivo* nicht durch IP-10 alleine stimulierbar (Taub *et al.*, 1996). Es ist denkbar, dass die transepidermale Chemotaxis von T-Lymphozyten durch mehrere Faktoren reguliert wird. Experimentell wurde diese Hypothese noch nicht verifiziert.

Bei C-C Chemokinen sind im Gegensatz zu C-X-C Chemokinen die ersten beiden strukturell konservierten Cysteine im N-terminalen Bereich nicht durch eine Aminosäure getrennt. Die Expression des C-C Chemokins RANTES in HaCat-Zellen nach Stimulation mit LILA wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt (Bülow, 1997). RANTES wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten, eosinophile Granulozyten und Monozyten (Schröder, 1995b). Eosinophile Granulozyten und Monozyten sind in von Pilzen befallenen und entzün-

deten Bereichen der Haut nicht nachzuweisen (Dahl, 1994), könnten jedoch durch andere Faktoren an der Migration gehindert werden.

Die Genexpression von MCP-1, einem weiteren C-C Chemokin konnte nach Stimulation mit LILA in HaCat-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden (Bülow, 1997). Dieses für Monozyten chemotaktisches Chemokin reguliert auch die Adhärenz von Monozyten an Endothelzellen. Da Monozyten in den von Pilzen befallenen Hautbereichen nicht auftreten (Dahl, 1994), bleibt der Zusammenhang mit der LILA-induzierbarkeit dieses Chemokins unklar.

Neben Zellen des Epithels wie Keratinozyten wurde auch untersucht, ob dermale Fibroblasten auf einen LILA-Stimulus durch Expression von Zytokinen reagieren. Es konnte eine LILA-induzierte Expression der Zytokine IL1- α , IL1- β , des C-X-C Chemokins IP-10 und des C-C Chemokin MCP-1 gezeigt werden. Eine LILA-induzierte mRNA Expression von TNF- α , IL-8, IL-8 Rezeptor A und B, ENA-78, RANTES sowie MCP-3 in Fibroblasten ließ sich nicht nachweisen (Bülow, 1997). Dermale Fibroblasten produzieren, im Gegensatz zu Keratinozyten, hauptsächlich pro-IL1- β , das sie jedoch nicht in die aktive Form umwandeln können (Elias *et al.*, 1989). Die gezeigte MCP-1 Expression nach Stimulation mit LILA kann auch durch die LILA-induzierte IL-1 α Expression erklärt werden, da IL-1 α die MCP-1 Expression stimuliert (Strieter *et al.*, 1989).

Sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten reagieren auf LILA mit der mRNA-Expression verschiedener Zytokine. Es ist unklar, inwieweit die durchgeführten Zellkulturexperimente auf *in vivo* Situationen übertragbar sind. Generell deuten die Daten jedoch darauf hin, dass es sich bei LILA um eine Signalsubstanz handelt, die als Neutrophilen-Chemotaxin auch Wirkungen auf epitheliale Zellen hat, und somit eine wichtige Rolle innerhalb der epithelialen Abwehr spielen könnte.

Die Erkennung von Erregern basiert grundsätzlich auf der Reaktion auf verschiedene Elemente des Erregers. Für Pilze werden hierfür außer LILA auch Keratinase (Hino *et al.*, 1982), Polysaccharide und Lipide aus hitzeinaktivierten Pilzsporen (Andersson *et al.*, 1976) sowie ein niedermolekulares Signal, das während des Pilzwachstums gebildet wird (Tagami *et al.*, 1982) diskutiert.

Sind die Systeme zur Erkennung von Pilzen gestört, kann es zu schwerwiegenden Pilzinfektionen kommen: Patienten, deren neutrophile Granulozyten Defekte in der Chemotaxis und Phagozytose zeigen, leiden oft an chronischen Candidosen. Interessanterweise ist sowohl die humorale Immunantwort als auch das Komplementsystem bei diesen Patienten intakt (Kirkpatrick und Sohnle, 1981; Filler und Edwards, 1993).

Genauere Kenntnisse über das LILA-System können auch genutzt werden, die epitheliale Abwehr durch die Entwicklung neuer Pharmazeutika zu unterstützen. Eine gezielte Stimulation mit LILA-Derivaten könnte die menschliche Haut anregen, ihre Abwehrmechanismen gegen Pilze zu mobilisieren - gleichzeitig könnte jedoch auch eine massive Entzündung eintreten. Da es sich bei LILA möglicherweise um eine pilzspezifische Substanz handelt, könnten Stoffe, die in Pilzen die Biosynthese von LILA hemmen zu hochwirksamen Fungiziden entwickelt werden.

4.6 Das Synthetische Antioxidans TBBC als neuer Leukozytenaktivator

Mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden wurde ein synthetisches Antioxidans in LILA-5-Proben identifiziert. Das charakteristische Fragmentierungsmuster stimmte mit den Signalen von 4,4'-Thiobis(6-tert-Butyl-m-Cresol) (= TBBC) aus der NIST-Datenbank überein, welches ein Molekulargewicht von 358 besitzt (3.19).

In biologischen Tests bewirkte TBBC in neutrophilen Granulozyten eine dosisabhängige Induktion der Freisetzung der Myeloperoxidase nach Vorbehandlung mit Cytochalasin B. Trypanblau-Tests waren negativ, damit handelt es sich um keinen toxischen Effekt (3.19.2, Seite 76). Die Dosiswirkungskurve der Freisetzung der Myeloperoxidase aus neutrophilen Granulozyten zeigt angenähert einen glockenförmigen Verlauf (ED_{50} bei ca. 200 μM Abbildung 3-53, Seite 78), was als Hinweis auf einen rezeptorvermittelten Prozess gewertet werden kann.

TBBC (Synonyme: Bis(4-Hydroxy-5-tert-Butyl-2-Methylphenyl) Sulfide; Santowhite; Santonox; Sumilizer wx; Thioalkofen mbch; Lowinox 44S36) wird von der chemischen Industrie als Antioxidans in natürlichem und synthetischem Gummi, sowie in Polyolefin-Plastik, Harz, Klebstoff, Petroleum und Plastik eingesetzt. Es war nicht möglich, die Herkunft des TBBC in LILA-Präparationen zu klären. Da es sich bei TBBC um eines der häufigst eingesetzten Antioxidantien handelt, ist eine Verunreinigung über Lösungsmittel oder Kunststoffdichtungen denkbar.

Bereits 1992 wurde gezeigt, dass bei Patienten, die gegen die üblichen Kunststoffallergene Patch-Test negativ waren, TBBC eine allergische Kontaktdermatitis auslösen kann (Rich *et al.*, 1991). Die ED_{50} von 20 μM kann beim Tragen von Latexhandschuhen erreicht werden (Rich *et al.*, 1991). Die hydrophoben Eigenschaften von TBBC ermöglichen zudem eine Membrangängigkeit der Substanz. In diesem Zusammenhang deuten unsere Daten darauf hin, dass TBBC, welches als nahezu universelles Antioxidans eingesetzt wird, die Infiltration von neutrophilen Granulozyten im Rahmen einer allergischen Kontaktdermatitis verursachen kann.

4.7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein neuartiges Pathogenmuster-assoziiertes Molekül aus Pilzen isoliert und sowohl hinsichtlich der chemischen Struktur als auch hinsichtlich biologischer Eigenschaften charakterisiert werden. Dieser lipidartige Leukozytenaktivator (LILA) spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten während einer entzündlichen Dermatomykose. Daneben konnten auch erste Hinweise auf die Existenz eines LILA-Rezeptors gesammelt werden. Mit den experimentell ermittelten Daten war es möglich, ein postuliertes Modell für die LILA-Signaltransduktion in PMN zu erstellen. Für eine weitere Charakterisierung des LILA-Systems ist es notwendig, den zugehörigen Rezeptor zu isolieren und sowohl biochemisch als auch molekularbiologisch zu untersuchen. Die Kenntnis der DNA-Sequenz des Rezeptors würde es ermöglichen, zu überprüfen, in welchen Zellen, Geweben und zu welchem Zeitpunkt der Rezeptor exprimiert wird. Zusätzlich sollte mit Hilfe molekularbiologischer Techniken die Hypothese überprüft werden, ob das LILA-System phylogenetisch alt und somit auch weit verbreitet ist. Besonders interessant ist hierbei die Frage, ob Gewebe von Insekten und Pflanzen, die sich vor Pilzen schützen müssen, ebenfalls einen LILA-Rezeptor besitzen. Die Wirkung von Elizitoren (Aktivatoren der pflanzlichen Abwehrmechanismen, nicht pilzlichen Ursprungs) ist in Pflanzen bereits nachgewiesen worden, jedoch sind bislang keine Rezeptoren für diese Substanzen bekannt (Dixon und Lamb, 1990). In die Gruppe dieser Experimente sollten sich auch *in-vivo*-Untersuchungen eingliedern, da bislang nur mit isolierten Modellsystemen oder Zellkulturen gearbeitet wurde.

Da es sich bei LILA um mehrere Mitglieder einer Molekülfamilie mit gemeinsamem Strukturprinzip handelt, müsste auch geklärt werden, ob mehrere Rezeptoren jeweils unterschiedliche LILAs binden, oder ob ein Rezeptor aufgrund der gemeinsamen Strukturmerkmale der LILA-Familie alle LILAs binden kann.

Ein Fernziel kann es sein, die Erkenntnisse über das LILA-System dazu zu verwenden, Nutzpflanzen mit LILA-Derivaten zu stimulieren, um, wie bereits für die Stimulation mit anderen Elizitoren gezeigt (Fritig *et al.*, 1998), ihre eigene Pilzabwehr zu mobilisieren. Erregerspezifische Substanzen werden häufig als Ziel zur Entwicklung von Pharmazeutika verwendet. Da es sich bei LILA möglicherweise um eine pilzspezifische Substanz handelt, könnten Hemmstoffe der LILA-Biosynthese zu hochwirksamen Fungiziden für den klinischen Einsatz weiterentwickelt werden.

5 Zusammenfassung

Alle Epithelien, die regelmäßig in Kontakt mit Keimen treten, besitzen entsprechende Abwehrmechanismen. Demzufolge findet man in der Haut eine Reihe von Verteidigungsebenen gegen Dermatophyten. Neben den passiven Schutzvorrichtungen wie antimikrobielle Substanzen, Bakterien der normalen Hautflora, mangelnde Feuchtigkeit, die Barrierefunktion des *Stratum corneum* und das Abwerfen toter Hautzellen (Desquamation) ist die menschliche Haut auch in der Lage, sich aktiv gegen Pilze zur Wehr zu setzen. Die wichtigste Abwehrzelle ist hierbei der neutrophile Granulozyt. Dieser Zelltyp besitzt die Fähigkeit, das Blutgefäß zu verlassen und in Richtung Entzündungsherd zu wandern, um den Erreger dort zu bekämpfen. Voraussetzung für diese Abwehrreaktion ist die Erkennung des pathogenen Pilzes auf der Hautoberfläche.

Für bakterielle Infektionen sind solche Erkennungsmechanismen bereits bekannt: Formylierte Methionyl-Peptide aus Bakterien können neutrophile Granulozyten direkt aktivieren. Es ist demnach denkbar, dass sich im Laufe der Evolution ähnliche direkte Erkennungsmechanismen zwischen Eukaryonten und Pilzen entwickelt haben. Für Pilzinfektionen konnten jedoch derartige pathogenassoziierten Moleküle bislang noch nicht identifiziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pathogenassoziierten Moleküle aus Dermatophyten, die von neutrophilen Granulozyten erkannt werden, zu isolieren und zu charakterisieren. Vorausgegangene Arbeiten im Rahmen des Projektes haben ergeben, dass das leukozytenaktivierende Signal ausschließlich in der Lipidphase der Dermatophyten lokalisiert ist. Rezeptordeaktivierungsexperimente deuteten auf die Existenz eines eigenen Rezeptors für den lipidartigen Leukozytenaktivator (lipidartiger Leukozytenaktivator = LILA) hin. Da auch die apathogene Hefe *Saccharomyces cerevisiae* den chemotaktischen Faktor enthielt, war es möglich, größere Mengen zu isolieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden LILA-Präparationen von Verunreinigungen getrennt und anschließend mit Hilfe massenspektrometrischer und kernspinresonanzspektroskopischer Methoden untersucht. Mit diesen Daten konnte eine Strukturhypothese aufgestellt werden. Interessanterweise handelt es sich bei LILA nicht um ein einziges Molekül, sondern um eine Gruppe von Molekülen, deren einzelne Mitglieder alle dem selben Strukturmotiv folgen: Eine gleichbleibende, polare Kerngruppe mit zwei wechselnden Fettsäureresten.

Um den Strukturvorschlag zu belegen, wurde versucht, synthetisches LILA herzustellen und die Produkte sowohl in ihren chemischen als auch in ihren biologischen Charakteristika mit den natürlichen Äquivalenten zu vergleichen. Natürliches und synthetische LILAs waren in allen untersuchten chemischen und biologischen Eigenschaften ununterscheidbar, damit sprechen die Daten für eine Übereinstimmung der Strukturhypothese mit dem natürlichen LILA. Bislang sind in der Literatur keine mit LILA chemisch oder biologisch vergleichbaren Substanzen bekannt.

Die Bedeutung von LILA für die epitheliale Abwehr wird durch Untersuchungen belegt, die zeigten, dass Keratinozyten und Fibroblasten nach LILA-Stimulation verschiedene proinflammatorische und regulatorische Zytokine exprimieren. Im Vordergrund steht hier besonders das C-X-C Chemokin IL-8, das chemotaktisch auf die an der Pilzabwehr beteiligten neutrophilen Granulozyten wirkt.

Synthetisch hergestellte Leukozytenaktivatoren wurden verwendet, um erste Daten über den Signaltransduktionsweg von LILA in neutrophilen Granulozyten zu gewinnen. LILA-Signale in Granulozyten werden über einen G_i -Protein-vermittelten Prozess weitergeleitet, unter Beteiligung der Phospholipase $C\beta$, der Myristoyltransferase und der Carboxylmethyltransferase. Über den Botenstoff Inositol-(1,4,5)Trisphosphat kommt es innerhalb von 3-10 Sekunden zu einer Steigerung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration von 50 nM auf 150 nM. Die Kalziumionen stammen sowohl aus den intrazellulären Speicherkompartimenten als auch aus dem extrazellulären Medium.

LILA stellt somit eine Signalsubstanz dar, die vergleichbar mit bakteriellem FMLP, Effektorzellen des menschlichen Immunsystems direkt aktiviert. Die Hypothese einer direkten Aktivierung von Granulozyten durch pathogenassoziierte Moleküle konnte im Rahmen dieser Arbeit untermauert werden.

Da LILA in bislang allen untersuchten Pilzen gefunden wurde, alle nicht pilzartigen Organismen jedoch kein LILA enthielten, ist es möglich, dass es sich um eine pilzspezifische und für den Pilz essentielle Substanz handelt. Damit wäre die Hemmung der LILA-Biosynthese in Pilzen ein Ziel zur Entwicklung hochwirksamer Fungizide, welche sowohl bei Nutzpflanzen als auch im klinischen Bereich eingesetzt werden könnten.

Weitere Untersuchungen zum LILA-System werden es ermöglichen, genaueren Einblick in die Interaktionen zwischen Dermatophyt, neutrophilem Granulozyt und Epidermiszellen zu bekommen.

6 Literaturverzeichnis

- Ajello, L. (1974). Natural history of the dermatophytes and related fungi. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 53, 93-110.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 27489-27494.
- Ali, H., Richardson, R.M., Tomhave, E.D., DuBose, R.A., Haribabu, B., and Snyderman, R. (1994). Regulation of stably transfected platelet activating factor receptor in RBL-2H3 cells. Role of multiple G proteins and receptor phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 24557-24563.
- Andersson, B.A., Hellgren, L., and Vincent, J. (1976). Allergic delayed skin reactions from lipid fractions of trichophytin. *Sabouraudia.* 14, 237-241.
- Andersson, T., Dahlgren, C., Pozzan, T., Stendahl, O., and Lew, P.D. (1986). Characterization of fMet-Leu-Phe receptor-mediated Ca²⁺ influx across the plasma membrane of human neutrophils. *Mol. Pharmacol.* 30, 437-443.
- Ansel, J., Perry, P., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., Luger, T., and Hefenieder, S. (1990). Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J. Invest Dermatol.* 94, 101S-107S.
- Babior, B.M. (1992). The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* 65, 49-95.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55, 97-179.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 675-705.
- Becker, E.L., Kermode, J.C., Naccache, P.H., Yassin, R., Munoz, J.J., Marsh, M.L., Huang, C.K., and Sha'afi, R.I. (1986). Pertussis toxin as a probe of neutrophil activation. *Fed. Proc.* 45, 2151-2155.
- Berk, S.H., Penneys, N.S., and Weinstein, G.D. (1976). Epidermal activity in annular dermatophytosis. *Arch. Dermatol.* 112, 485-488.
- Bibel, D.J., Aly, R., Shah, S., and Shinefield, H.R. (1993). Sphingosines: antimicrobial barriers of the skin. *Acta Derm. Venereol.* 73, 407-411.
- Bojanovsky, A. and Bals, W. (1980). Leukotaktische Fähigkeit von humanen und zoophilen Dermatophyten. *Mykosen* 684-690.
- Borregaard, N., Løllike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H., and Bainton, D.F. (1993). Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* 51, 187-198.

- Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., and Fusenig,N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761-771.
- Boyden,S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibodies and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 453-466.
- Boyum,A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* 97, 31-50.
- Brandis,H. and Pulverer,G. (1988). *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie.* Gustav. Fischer. Verlag. , Stuttgart.
- Brasch, J., Schröder, J. M., and Christophers, E. Chemotaktische Wirkung von Dermatophyten-Extrakten auf neutrophile Granulozyten. *Fortschritte der Mykologie* 1991, 71-76. 1991. Hornstein, O.P. und Meinhof, W. eds.; perimed-Verlag Erlangen.
- Brasch,J., Schröder,J.M., and Christophers,E. (1991a). Serum-independent neutrophil chemotaxins in the yeast phase of *Candida albicans*. *Mycoses.* 34, 35-39.
- Brasch,J., Schröder,J.M., and Christophers,E. (1992). *Candida albicans* grown in glucose-free media contains serum-independent chemotactic activity. *Acta Derm. Venereol.* 72, 1-3.
- Braun-Falco,O., Plewig,G., and Wolff,H.H. (1984). *Dermatologie und Venerologie.*
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W., and Osborn, R. W. Antimicrobial peptides from plants. *Crit.Rev.Plant.Sci.* 16, 297-323. 1997.
- Bülow, M. Charakterisierung einer Leukozytenaktivierenden Substanz auf Hefen. 1-5-1997. Dissertation, Universitäts Hautklinik Kiel.
- Bülow,M., Kahlke,B., Brasch,J., Christophers,E., and Schröder,J.M. (1996). [LILAs (lipid-like leukocyte activators) isolated from *Saccharomyces cerevisiae* induce calcium mobilization in human neutrophilic granulocytes] Aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierte LILAs (Lipid-like leukocyte activators) induzieren Kalziumeinstrom in humane neutrophile Granulozyten. *Mycoses.* 39 *Suppl* 1, 87-93.
- Calderone,R.A. (1993). Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends in Microbiology* 55-58.
- Casey,P.J. (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 219-225.
- Cassatella,M.A., Bazzoni,F., Ceska,M., Ferro,I., Baggiolini,M., and Berton,G. (1992). IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J. Immunol.* 148, 3216-3220.

- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268.
- Coffer, P.J., Geijsen, N., M'Rabet, L., Schweizer, R.C., Maikoe, T., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., and Koenderman, L. (1998). Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem. J.* 329 (Pt 1), 121-130.
- Creamer, H.R., Gabler, W.L., and Bullock, W.W. (1983). Endogenous component chemotactic assay (ECCA). *Inflammation* 7, 321-329.
- Creer, M.H. and Gross, R.W. (1985). Separation of isomeric lysophospholipids by reverse phase HPLC. *Lipids* 20, 922-928.
- Cronstein, B.N. and Weissmann, G. (1993). The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 36, 147-157.
- Cunningham, C.C., Stossel, T.P., and Kwiatkowski, D.J. (1991). Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science* 251, 1233-1236.
- Cutler, J.E. (1977). Chemotactic factor produced by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 18, 568-573.
- Dahl, M.V. (1987). Immunological resistance to dermatophyte infections. *Adv. Dermatol.* 2, 305-320.
- Dahl, M.V. (1994). Dermatophytosis and the immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31, S34-S41.
- Davies, R.R. and Zaini, F. (1984). Enzymic activities of *Trichophyton rubrum* and the chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. *Sabouraudia.* 22, 235-241.
- Dewald, B., Moser, B., Barella, L., Schumacher, C., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1992). IP-10, a gamma-interferon-inducible protein related to interleukin-8, lacks neutrophil activating properties. *Immunol. Lett.* 32, 81-84.
- Dixon, R. A. and Lamb, C. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Physiology* 41, 339-367. 1990
- Doke, N., Garas, N. A., and Kuc, J. Partial characterizations and aspects of mode of actions of a hypersensitivity-inhibiting factor (HIF) isolated from *Phytophthora infestans*. *Physiol.Plant.Pathol* 15, 127-140. 1979.
- Doke, N., Miura, Y., Sanchez, L.M., Park, H.J., Noritake, T., Yoshioka, H., and Kawakita, K. (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene* 179, 45-51.
- Durant, G. L. An Improved Synthesis of N,N-Diarylureas. *Chemistry & Industry (London)* 7. 8-7-1965
- Elias, J.A., Reynolds, M.M., Kotloff, R.M., and Kern, J.A. (1989). Fibroblast interleukin 1 beta: synergistic stimulation by recombinant interleukin 1 and tumor re-

crisis factor and posttranscriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 6171-6175.

Fehlbaum,P., Bulet,P., Michaut,L., Lagueux,M., Broekaert,W.F., Hetru,C., and Hoffmann,J.A. (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J. Biol. Chem.* 269, 33159-33163.

Filler, S. G. and Edwards, J. E. Jr. Chronic mucocutaneous candidiasis. Fungal infections and immune responses , 117-133. 1993. New York, J.W. Murphy, H.Friedman, M.Bendinelli

Fritig,B., Heitz,T., and Legrand,M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 16-22.

Fukazawa,Y., Cassone,A., Bistoni,F., Howard,D.A., Kagaya,K., and Wu-Hsieh,B.A. (1994). Mechanisms of cell-mediated immunity in fungal infection. *J. Med. Vet. Myc.* 123-131.

Gabay,J.E. (1994). Ubiquitous natural antibiotics. *Science* 264, 373-374.

Garrod,D.R. (1986). Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. *J. Cell Sci. Suppl* 4, 221-237.

Goldstein,I., Hoffstein,S., Gallin,J., and Weissmann,G. (1973). Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes: microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 70, 2916-2920.

Grynkiewicz,G., Poenie,M., and Tsien,R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.

Hallett,M.B., Davies,E.V., and Pettit,E.J. (1996). Fluorescent Methods for Measuring and Imaging Cytosolic Free Ca²⁺ in Neutrophils. *Methods* 9, 591-606.

Harder,J., Bartels,J., Christophers,E., and Schröder,J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin [letter] [see comments]. *Nature* 387, 861.

Harris,A.S. and Morrow,J.S. (1990). Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 3009-3013.

Hartwig,J.H., Thelen,M., Rosen,A., Janmey,P.A., Nairn,A.C., and Aderem,A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618-622.

Haskill,S., Peace,A., Morris,J., Sporn,S.A., Anisowicz,A., Lee,S.W., Smith,T., Martin,G., Ralph,P., and Sager,R. (1990). Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 7732-7736.

- Hazes,B., Boodhoo,A., Cockle,S.A., and Read,R.J. (1996). Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor. *J. Mol. Biol.* 258, 661-671.
- Hendey,B., Klee,C.B., and Maxfield,F.R. (1992). Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science* 258, 296-299.
- Henson,P.M. (1971). The immunological release of constituents from neutrophil leukocytes. *J. Immunol.* V 1535-1546.
- Hino,H., Ammitzboll,T., Svejgaard,E., Kobayasi,T., and Asboe-Hansen,G. (1982). Acantholysis induced by proteolytic enzymes. II. Enzyme fractions produced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Acta Derm. Venereol.* 62, 283-288.
- Jaconi,M.E., Lew,D.P., Carpentier,J.L., Magnusson,K.E., Sjogren,M., and Stendahl,O. (1990). Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.* 110, 1555-1564.
- Janeway,C.A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13, 11-16.
- Johnson,K.J., Varani,J., and Smolen,J.E. (1992). Neutrophil activation and function in health and disease. *Immunol. Ser.* 57, 1-46.
- Kaaman,T. (1985). Dermatophyte antigens and cell-mediated immunity in dermatophytosis. *Curr. Top. Med. Mycol.* 1, 117-134.
- Kahlke, B. Untersuchungen zur Sekretion neutrophilenaktivierender Faktoren aus Dermatophyten. 1989. Diplomarbeit, Universitäts Hautklinik Kiel.
- Kahlke, B. Vergleichende biologische Charakterisierung der proinflammatorischen Eigenschaften von Ascomyceten-Stoffwechselprodukten in humanen *in vitro* Modellen. 1993. Dissertation, Universitäts Hautklinik Kiel.
- Kahlke,B., Brasch,J., Christophers,E., and Schröder,J.M. (1996). Dermatophytes contain a novel lipid-like leukocyte activator. *J. Invest. Dermatol.* 107, 108-112.
- Kaneko, H., Hosohara, M., Tanaka, M., and Itoh, T. Lipid Composition of 30 Species of Yeast. *Lipids* 11, 837-844. 1975.
- Kaplan,G., Luster,A.D., Hancock,G., and Cohn,Z.A. (1987). The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 166, 1098-1108.
- Kauffman,C.A., Shea,M.J., and Frame,P.T. (1981). Invasive fungal infections in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Arch. Intern. Med.* 141, 1076-1079.
- Kawohl,G., Szperalski,B., Schröder,J.M., and Christophers,E. (1980). Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in psoriasis: enhancement by self-activated serum. *Br. J. Dermatol.* 103, 527-533.

- Kay,A.B. (1976). Functions of the eosinophil leucocyte. *Br. J. Haematol.* 33, 313-318.
- Keller,H.U. and Sorkin,E. (1968). Chemotaxis of leucocytes. *Experientia* 24, 641-652.
- Keller,H.U., Wilkinson,P.C., Abercrombie,M., Becker,E.L., Hirsch,J.G., Miller,M.E., Ramsey,W.S., and Zigmond,S.H. (1977). A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells. *Cell Biol. Int. Rep.* 1, 391-397.
- King, R. D., Cunico, R. L., Maibach, H. I., Foye, J. C., Greenberg, J. H., and Jones, H. E. Transferrin, iron and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 86, 204-212. 1975.
- Kirkpatrick, C. H. and Sohnle, P. G. Chronic mucocutaneous candidiasis. B.Safari & R.A.Good (ed), *Immunodermatology*, Plenum Press, New York . 1981.
- Krueger,J.G., Krane,J.F., Carter,D.M., and Gottlieb,A.B. (1990). Role of growth factors, cytokines, and their receptors in the pathogenesis of psoriasis. *J. Invest Dermatol.* 94, 135S-140S.
- Kupper,T.S. (1988). Interleukin 1 and other human keratinocyte cytokines: molecular and functional characterization. *Adv. Dermatol.* 3, 293-307.
- Kurimoto,I., Arana,M., and Streilein,J.W. (1994). Role of dermal cells from normal and ultraviolet B-damaged skin in induction of contact hypersensitivity and tolerance. *J. Immunol.* 152, 3317-3323.
- Kwon,N.S., Nathan,C.F., Gilker,C., Griffith,O.W., Matthews,D.E., and Stuehr,D.J. (1990). L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J. Biol. Chem.* 265, 13442-13445.
- Landon,C., Sodano,P., Hetru,C., Hoffmann,J., and Ptak,M. (1997). Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Sci.* 6, 1878-1884.
- Larsen,C.G., Anderson,A.O., Oppenheim,J.J., and Matsushima,K. (1989). Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 68, 31-36.
- Lehrer,R.I. and Ganz,T. (1996). Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 797, 228-239.
- Lepidi,H., Zaffran,Y., Ansaldi,J.L., Mege,J.L., and Capo,C. (1995). Morphological polarization of human polymorphonuclear leucocytes in response to three different chemoattractants: an effector response independent of calcium rise and tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 4), 1771-1778.

- Levy, J.H. (1996). The human inflammatory response. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 27 Suppl 1, S31-S37.
- Loos, M. (1985). The complement system: activation and control. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 121, 7-18.
- Luster, A.D. and Ravetch, J.V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med.* 166, 1084-1097.
- Mannion, B.A., Weiss, J., and Elsbach, P. (1990). Separation of sublethal and lethal effects of polymorphonuclear leukocytes on *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest* 86, 631-641.
- Matsushima, K. and Oppenheim, J.J. (1989). Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine.* 1, 2-13.
- McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M., Whittle, B.J., and Moncada, S. (1989). Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem. J.* 261, 293-296.
- Meers, P., Ernst, J.D., Duzgunes, N., Hong, K.L., Fedor, J., Goldstein, I.M., and Papahadjopoulos, D. (1987). Synexin-like proteins from human polymorphonuclear leukocytes. Identification and characterization of granule-aggregating and membrane-fusing activities. *J. Biol. Chem.* 262, 7850-7858.
- Merritt, J.E., Jacob, R., and Hallam, T.J. (1989). Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 264, 1522-1527.
- Meshulam, T., Billah, M. M., Eckel, S., Griendling, K. K., and Diamond, R. D. Relationship of phospholipase C- and phospholipase D-mediated remodeling pathways to respiratory burst activations in human neutrophils stimulated by *Candida albicans*. *J. Leukoc. Biol.* 57, 842-850. 1995.
- Mishra, P. and Prasad, R. (1990). An overview of lipids of *Candida albicans*. *Prog. Lipid Res.* 29, 65-85.
- Miyake, Y., Yasuhara, K., Fukui, H., Suginaka, H., Nakajima, T., and Moriyama, T. (1983). Purification and characterization of neutrophil chemotactic factors of *Streptococcus sanguis*. *Biochem. Biophys. Acta* 181-186.
- Mizutani, H., Black, R., and Kupper, T.S. (1991). Human keratinocytes produce but do not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. *J. Clin. Invest* 87, 1066-1071.
- Mobacken, H., Lindholm, L., and Olling, S. (1977). Deficient neutrophil function in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis, thymoma and myasthenia gravis. *Acta Derm. Venereol.* 57, 335-339.
- Moriarty, T.M., Padrell, E., Carty, D.J., Omri, G., Landau, E.M., and Iyengar, R. (1990). G_o protein as signal transducer in the pertussis toxin-sensitive phosphatidylinositol pathway. *Nature* 343, 79-82.

- Mrowietz,U. and Ternowitz,T. (1987). Monocyte chemotaxis: a method for routine in vitro investigation using lactic dehydrogenase as a marker enzyme. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C.] 95*, 1-7.
- Naccache,P.H., Molski,T.F., Borgeat,P., White,J.R., and Sha'afi,R.I. (1985). Phorbol esters inhibit the fMet-Leu-Phe- and leukotriene B₄-stimulated calcium mobilization and enzyme secretion in rabbit neutrophils. *J. Biol. Chem. 260*, 2125-2131.
- Nadler,M.J., Harrison,M.L., Ashendel,C.L., Cassady,J.M., and Geahlen,R.L. (1993). Treatment of T cells with 2-hydroxymyristic acid inhibits the myristoylation and alters the stability of p56lck. *Biochemistry 32*, 9250-9255.
- Neer,E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell 80*, 249-257.
- Negi,M., Tsuboi,R., Matsui,T., and Ogawa,H. (1984). Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity. *J. Invest Dermatol. 83*, 32-36.
- Nestle,F.O., Zheng,X.G., Thompson,C.B., Turka,L.A., and Nickoloff,B.J. (1993). Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets [published erratum appears in *J Immunol* 1994 Jan 1;152(1):376]. *J. Immunol. 151*, 6535-6545.
- Odds, F. C. *Candida and Candidosis*. 2nd ed. London-Philadelphia-Toronto-Sydney-Tokyo: Baillière Tindall . 1988.
- Ohki,S. and Duax,J. (1986). Effects of cations and polyamines on the aggregation and fusion of phosphatidylserine membranes. *Biochim. Biophys. Acta 861*, 177-186.
- Philips,M.R., Pillinger,M.H., Staud,R., Volker,C., Rosenfeld,M.G., Weissmann,G., and Stock,J.B. (1993). Carboxyl methylation of Ras-related proteins during signal transduction in neutrophils. *Science 259*, 977-980.
- Pozzan,T., Lew,D.P., Wollheim,C.B., and Tsien,R.Y. (1983). Is cytosolic ionized calcium regulating neutrophil activation? *Science 221*, 1413-1415.
- Preissner,W.C., Schröder,J.M., and Christophers,E. (1983). Altered polymorphonuclear leukocyte responses in psoriasis: chemotaxis and degranulation. *Br. J. Dermatol. 109*, 1-8.
- Quintans,J. (1994). Immunity and inflammation: the cosmic view. *Immunol. Cell Biol. 72*, 262-266.
- Ratray,J.B., Schibeci,A., and Kidby,D.K. (1975). Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev. 39*, 197-231.
- Rich,P., Belozer,M.L., Norris,P., and Storrs,F.J. (1991). Allergic contact dermatitis to two antioxidants in latex gloves: 4,4'-thiobis(6-tert-butyl-meta-cresol) (Lowinox 44S36) and butylhydroxyanisole. Allergen alternatives for glove-

allergic patients [published erratum appears in *J Am Acad Dermatol* 1992 Jan;26(1):144]. *J. Am. Acad. Dermatol.* 24, 37-43.

Rippon,J.W. and Garber,E.D. (1969). Dermatophyte pathogenicity as a function of mating type and associated enzymes. *J. Invest Dermatol.* 53, 445-448.

Rogers,T.J. and Balish,E. (1980). Immunity to *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 44, 660-682.

Rot,A., Henderson,L.E., Copeland,T.D., and Leonard,E.J. (1987). A series of six ligands for the human formyl peptide receptor: Tetrapeptides with high chemotactic potency and efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7967-7971.

Rothman, S. A., Smiljanic, A. L., Shapiro, A. L., and Weitkamp, A. W. The spontaneous cure of tinea capitis in puberty. *J.Invest Dermatol.* 8, 81-98. 1947.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Bd 1-2, 2nd Ed. 1989.

Schall,T.J., Bacon,K., Toy,K.J., and Goeddel,D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671.

Scheel,D. and Parker,J.E. (1990). Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. *Z. Naturforsch. [C.]* 45, 569-575.

Schiffmann,E., Corcoran,B.A., and Wahl,S.M. (1975). N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1059-1062.

Schröder,J.M. (1995a). Cytokine networks in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 105, 20S-24S.

Schröder,J.M. (1995b). Inflammatory mediators and chemoattractants. *Clin. Dermatol.* 13, 137-150.

Schröder,J.M. (1997). Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease. *Methods Enzymol.* 288, 266-297.

Schröder,J.M., Mrowietz,U., and Christophers,E. (1988). Purification and partial biologic characterization of a human lymphocyte-derived peptide with potent neutrophil-stimulating activity. *J. Immunol.* 140, 3534-3540.

Schröder,J.M., Mrowietz,U., Morita,E., and Christophers,E. (1987). Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J. Immunol.* 139, 3474-3483.

Schröder, J. M., Sticherling, M., and Christophers, E. Interleukin 8 and other structurally related cytokines. Luger, T.A.& Schwarz T.(eds).*Epidermal cytokines*, 98-112. 1994. CRC Press, Boca Raton, Fl

- Shaw,A.S., Chalupny,J., Whitney,J.A., Hammond,C., Amrein,K.E., Kavathas,P., Sefton,B.M., and Rose,J.K. (1990). Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase. *Mol. Cell Biol.* *10*, 1853-1862.
- Sohnle,P.G. and Hahn,B.L. (1989). Epidermal proliferation and the neutrophilic infiltrates of experimental cutaneous candidiasis in mice. *Arch. Dermatol. Res.* *281*, 279-283.
- Sousa,C., Stahl,P.D., and Austyn,J.M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* *178*, 509-519.
- Spiegel,A.M., Backlund,P.S., Jr., Butrynski,J.E., Jones,T.L., and Simonds,W.F. (1991). The G protein connection: molecular basis of membrane association [published erratum appears in *Trends Biochem Sci* 1992 May;17(5):177]. *Trends Biochem. Sci.* *16*, 338-341.
- Sternweis,P.C. and Smrcka,A.V. (1992). Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem. Sci.* *17*, 502-506.
- Stingl,G. (1993). The skin: initiation and target site of immune responses. *Recent Results Cancer Res.* *128*, 45-57.
- Strieter,R.M., Standiford,T., Chensue,S.W., Kasahara,K., and Kunkel,S.L. (1991). Induction and regulation of interleukin-8 gene expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* *305*, 23-30.
- Strieter,R.M., Wiggins,R., Phan,S.H., Wharram,B.L., Showell,H.J., Remick,D.G., Chensue,S.W., and Kunkel,S.L. (1989). Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *162*, 694-700.
- Tagami,H., Natsume,N., Aoshima,T., Inoue,F., Suehisa,S., and Yamada,M. (1982). Analysis of transepidermal leukocyte chemotaxis in experimental dermatophytosis in guinea pigs. *Arch. Dermatol. Res.* *273*, 205-217.
- Tatrai,A., Lee,S.K., and Stern,P.H. (1994). U-73122, a phospholipase C antagonist, inhibits effects of endothelin-1 and parathyroid hormone on signal transduction in UMR-106 osteoblastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1224*, 575-582.
- Taub,D.D., Lloyd,A.R., Conlon,K., Wang,J.M., Ortaldo,J.R., Harada,A., Matsu-shima,K., Kelvin,D.J., and Oppenheim,J.J. (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1809-1814.
- Taub,D.D., Longo,D.L., and Murphy,W.J. (1996). Human interferon-inducible protein-10 induces mononuclear cell infiltration in mice and promotes the migration of human T lymphocytes into the peripheral tissues and human peripheral blood lymphocytes-SCID mice. *Blood* *87*, 1423-1431.

Terras,F.R., Torrekens,S., Van Leuven,F., Osborn,R.W., Vanderleyden,J., Cammue,B.P., and Broekaert,W.F. (1993). A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. *FEBS Lett.* 316, 233-240.

Tuschil,A., Lam,C., Haslberger,A., and Lindley,I. (1992). Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J. Invest Dermatol.* 99, 294-298.

Voetman,A.A., Loos,J.A., and Roos,D. (1980). Changes in the levels of glutathione in phagocytosing human neutrophils. *Blood* 55, 741-747.

Wagner,D.K. and Sohnle,P.G. (1995). Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 317-335.

Walker,B.A. and Ward,P.A. (1992). Priming and signal transduction in neutrophils. *Biol. Signals.* 1, 237-249.

Walter,A., Steer,C.J., and Blumenthal,R. (1986). Polylysine induces pH-dependent fusion of acidic phospholipid vesicles: a model for polycation-induced fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 861, 319-330.

Weiss,S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 320, 365-376.

Weitzman,I. and Summerbell,R.C. (1995). The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 240-259.

Wong,S.K. and Ross,E.M. (1994). Chimeric muscarinic cholinergic:beta-adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 18968-18976.

Zheng, M, Yang, H, and Mrowietz, U. Isolation of human monocyte subpopulations by single-step counterflow centrifugation on elutriation using a Sanderson chamber. Phenotypical and functional characterization of isolated cells. *Clin.Biotechnol.* 3, 197-201. 1991.

Zurita,J. and Hay,R.J. (1987). Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. *J. Invest Dermatol.* 89, 529-534.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Jens Schröder und Prof. Dr. Dr. Enno Christophers für die Themenstellung, die ständige Diskussionsbereitschaft während allen Arbeitsabschnitten sowie für die Hilfe bei der Interpretation physikochemischer Daten.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Jochen Brasch, der dieses Projekt ermöglicht hat.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Antony Mallet für die Durchführung und Betreuung der massenspektrometrischen und kernspinresonanzspektroskopischen Untersuchungen in London.

Für die freundschaftliche Atmosphäre und oftmals tatkräftige Hilfestellung danke ich den Mitarbeitern aus der Forschungsabteilung der Hautklinik, insbesondere Dörthe, Herbert, Jackson, Joachim, Jürgen, Lars, Nils und Ulf.

Dank gilt auch Signy, die mir jederzeit zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

7 Lebenslauf

Name:	Robert Häsler
Staatsangehörigkeit:	deutsch
17/02/1971	Geboren im Marienhospital Stuttgart als Sohn von Georg und Vera Häsler, Staatsangehörigkeit: Deutsch.
1977-79	Einschulung in die 1. Klasse der Altenburgschule in 70376 Stuttgart, Besuch der 1. und 2. Klasse.
1979-81	Besuch der 3.-4. Klasse der Zellerschule in 72202 Nagold.
1981-90	Besuch des Otto-Hahn-Gymnasiums in 72202 Nagold mit Abschluss Abitur am 16. Mai 1990
1990-92	Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Calw, einschliesslich einer Ausbildung zum Rettungshelfer.
Okt. 1991-Jun. 1993	Immatrikulation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Grundstudium der Biologie mit anschliessend abgelegter Vordiplomsprüfung.
Okt. 1993-Feb. 1995	Hauptstudium der Biologie an der Universität Konstanz, unter Teilnahme an den Vertiefungskursen Pflanzenphysiologie, Biochemische Chemie, Bioorganische Chemie, Biochemie der Zelle.
26 Juli 1995	mündliche Diplomprüfung bei Prof. Dr. D. Pette (Biochemie) und Prof. Dr. P. Böger (Pflanzenphysiologie).
1995-1996	Diplomarbeit an der Universität Konstanz, Fakultät für Biologie unter der Leitung von Prof. Dr. D. Pette und Abschluss des Studiums mit Diplom.
Seit April 1997	Promotionsstudium an der Universitäts-Hautklinik in Kiel unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. E. Christophers und Prof. Dr. J.-M. Schröder

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz, noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie ist nicht veröffentlicht, noch ist sie zur Veröffentlichung eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.