

4549 - 669 5

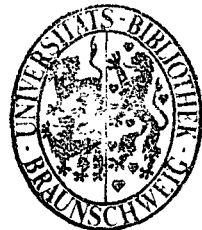
**Effekte von Weihrauchextrakten  
und Boswelliasäuren  
auf die Aktivitäten von NADPH-Oxidase,  
Caspase-1 und Humane Leukozytenelastase**

**Dissertation**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2001**

**vorgelegt von  
Kirstin Heil**



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Leukozyten und ihre Abwehrfunktionen.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 NADPH-Oxidase und reaktive Sauerstoffspezies .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2.1 Bestandteile des NADPH-Oxidase-Komplexes .....</b>	<b>3</b>
1.2.1.1 p47phox .....	3
1.2.1.2 p67phox .....	4
1.2.1.3 p40phox .....	6
1.2.1.4 p21rac .....	7
1.2.1.5 Cytochrom b <sub>558</sub> : p22phox und gp91phox .....	7
1.2.1.6 Rap1a .....	8
<b>1.2.2 Aktivierung und Regulation der NADPH-Oxidase .....</b>	<b>8</b>
1.2.2.1 Stimulatoren der Sauerstoffradikalbildung .....	8
1.2.2.2 Aktivierende und regulatorische Kinasen .....	10
<b>1.3 5-Lipoxygenase.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 Humane Leukozytenelastase .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 Caspasen in Entzündung und Apoptose .....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Weihrauch und Boswelliasäuren.....</b>	<b>17</b>
1.6.1 Pharmakologische Effekte.....	17
1.6.2 Klinische Untersuchungen .....	19
<b>1.7 Fragestellung .....</b>	<b>20</b>
1.7.1 NADPH-Oxidase.....	20
1.7.2 Humane Leukozytenelastase.....	21
1.7.3 Caspase-1.....	21
1.7.4 5-Lipoxygenase .....	21
<b>2 Material.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Versuchstiere .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Buffy Coats.....</b>	<b>23</b>

<b>2.3</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>23</b>
2.3.1	Zentrifugen .....	23
2.3.2	Elektrophorese und Western Blotting .....	23
2.3.3	Sonstige Geräte .....	23
<b>2.4</b>	<b>Chemikalien</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Lösungen</b> .....	<b>26</b>
2.5.1	<b>Lösungen zur Gewinnung von Zellen</b> .....	<b>26</b>
2.5.1.1	PBS (modifiziert nach Dulbecco) .....	26
2.5.1.2	Glykogenlösung .....	26
2.5.1.3	Ammoniumchlorid-Lysepuffer .....	26
2.5.1.4	Dextranlösung (2%) .....	26
2.5.1.5	Inkubationspuffer (IKP) .....	26
2.5.1.6	Trypanblau-Lösung 0,5% .....	27
2.5.2	Weihrauchextrakte .....	27
2.5.3	Lösungen von einzelnen Weihrauchinhaltsstoffen .....	27
2.5.4	<b>Luminometrische Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität</b> .....	<b>27</b>
2.5.4.1	Luminol-Lösung .....	27
2.5.4.2	fMLP-Lösung (80 mM) .....	28
2.5.4.3	Cytochalasin-B-Lösung .....	28
2.5.4.4	PMA-Lösung .....	28
2.5.4.5	Calciumchlorid-Lösung (150 mM) .....	28
2.5.4.6	Ionophor-Lösung (2mM) .....	28
2.5.5	<b>Kinase-Inhibitor-Lösungen</b> .....	<b>29</b>
2.5.5.1	Wortmannin (2 mM) .....	29
2.5.5.2	SKF-86002 (10 mM) .....	29
2.5.5.3	SB 203580 (10 mM) .....	29
2.5.5.4	PD 98059 (20 mM) .....	29
2.5.5.5	U 0126 (2 mM) .....	29
2.5.6	<b>Photometrische Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität</b> .....	<b>30</b>
2.5.6.1	Azidhaltiger PBS .....	30
2.5.6.2	Bradford Stammlösung zur Proteinbestimmung .....	30
2.5.6.3	Bradford Arbeitspuffer zur Proteinbestimmung .....	30
2.5.6.4	BSA-Stammlösung 1 mg/ml zur Erstellung der Eichgeraden .....	30
2.5.6.5	PMA-Lösung zur Translokationsstimulation .....	30
2.5.6.6	Sucroselösung (0,25 M) .....	30
2.5.6.7	Kaliumphosphatpuffer .....	31
2.5.6.8	Cytochrom C-Lösung 1 mM .....	31
2.5.6.9	Deoxycholat-Lösung 10% .....	31
2.5.6.10	NADPH-Lösung 1 mM .....	31
2.5.6.11	Superoxiddismutase-Lösung .....	31

<b>2.5.7</b>	<b>Gewinnung von 100.000 x g - Überständen</b> .....	<b>31</b>
2.5.7.1	Kavitationspuffer .....	31
2.5.7.2	Katalase-Lösung .....	32
2.5.7.3	DTT-Lösung (50 mM) .....	32
<b>2.5.8</b>	<b>Affinitätschromatographische Aufreinigung der 5-LO</b> .....	<b>32</b>
2.5.8.1	ATP-Agarose-Säule .....	32
2.5.8.2	PBS mit NaN <sub>3</sub> 0,01% .....	32
2.5.8.3	Phosphatpuffer 50 mM .....	32
2.5.8.4	DTT-Lösung (50 mM) .....	33
2.5.8.5	Katalase-Lösung .....	33
2.5.8.6	Equilibrierungspuffer .....	33
2.5.8.7	Puffer für die Salzwäsche .....	33
2.5.8.8	ATP-Lösung 20 mM .....	33
2.5.8.9	Harnstofflösung 6N .....	33
2.5.8.10	SDS-Lösung 20% .....	34
<b>2.5.9</b>	<b>5-Lipoxygenase-Grb2-Bindungsversuche</b> .....	<b>34</b>
2.5.9.1	Ovalbumin-Lösung .....	34
2.5.9.2	Calciumchlorid-Lösung (90 mM) .....	34
2.5.9.3	Phosphatidylcholin-Lösung .....	34
<b>2.5.10</b>	<b>SDS-PAGE</b> .....	<b>34</b>
2.5.10.1	SDS-Lösung (10%) .....	34
2.5.10.2	Ammoniumpersulfatlösung .....	34
2.5.10.3	TRIS-Puffer pH 8,8 (1,5 M) .....	35
2.5.10.4	TRIS-Puffer pH 6,8 (0,5 M) .....	35
2.5.10.5	10x Elektrodenpuffer .....	35
2.5.10.6	5x Lämmli-Puffer .....	35
2.5.10.7	Marker für SDS-PAGE .....	36
<b>2.5.11</b>	<b>Western Blot</b> .....	<b>36</b>
2.5.11.1	10x Transferpuffer .....	36
<b>2.5.12</b>	<b>Native Gelelektrophorese</b> .....	<b>36</b>
2.5.12.1	TRIS-Puffer pH 6,8 (1 M) .....	36
2.5.12.2	10x Elektrodenpuffer ohne SDS .....	37
2.5.12.3	5x Probenpuffer .....	37
<b>2.5.13</b>	<b>Antikörper-Lösungen</b> .....	<b>37</b>
2.5.13.1	Puffer für Antikörper .....	37
2.5.13.2	Primärer 5-Lipoxygenase-Antikörper .....	37
2.5.13.3	Sekundärer Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG) .....	37
2.5.13.4	Primärer Grb2-Antikörper .....	38
2.5.13.5	Sekundärer Antikörper (Anti-Maus-IgG) .....	38
<b>2.5.14</b>	<b>Photometrische Messung der HLE-Aktivität</b> .....	<b>38</b>
2.5.14.1	HLE .....	38
2.5.14.2	HLE-Substrat .....	38

2.5.15	Photometrische Messung der Caspase-1-Aktivität .....	38
2.5.15.1	Arbeitspuffer.....	38
2.5.15.2	Caspase-1.....	39
2.5.15.3	Caspase-1-Substrat .....	39
2.5.15.4	Arachidonsäurelösung (200 mM).....	39
3	Methoden .....	41
3.1	Gewinnung von Zellen.....	41
3.1.1	Gewinnung von Ratten-PMNL .....	41
3.1.2	Gewinnung von humanen PMNL.....	41
3.2	Testsysteme für die Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität.....	42
3.2.1	Chemolumineszenzmessung an der intakten Zelle.....	42
3.2.2	Photometrische Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität an der NADPH-Oxidase-angereicherten Membranfraktion.....	44
3.2.2.1	Präparation und Aktivierung.....	44
3.2.2.2	Fraktionierung.....	44
	a) Homogenisation .....	44
	b) Differenzialzentrifugation.....	44
3.2.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	44
3.2.2.4	Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität .....	45
3.3	Testsysteme für die 5-Lipoxygenase-Bindungsuntersuchungen .....	46
3.3.1	Gewinnung von 100.000 x g-Überständen.....	46
3.3.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung der 5-LO.....	46
3.3.3	5-Lipoxygenase-Grb2-Bindung: Agarosefällung .....	47
3.3.3.1	Inkubation und Präzipitation .....	47
3.3.3.2	SDS-PAGE .....	48
3.3.3.3	Western Blot.....	48
3.3.4	5-Lipoxygenase-Grb2-Bindung: elektrophoretische Trennung des Proteinkomplexes .....	49
3.3.4.1	Inkubation .....	49
3.3.4.2	Native Gelelektrophorese.....	49
3.3.4.3	Western Blot.....	50
3.4	Photometrische Messung der HLE-Aktivität .....	50
3.5	Photometrische Messung der Caspase-1-Aktivität .....	51
3.6	Statistik.....	51

4	Ergebnisse .....	53
4.1	Sauerstoffradikalbildung neutrophiler Granulozyten.....	53
4.1.1	Methodische Ergebnisse .....	53
4.1.1.1	Stimulator- und <i>Priming</i> -Effekte .....	54
4.1.1.2	Calciumeffekte .....	61
4.1.1.3	Stimulatorkonzentrationen .....	64
4.1.1.4	Weitere Stimulatoreffekte.....	65
4.1.2	Peritoneale Ratten-PMNL.....	66
4.1.2.1	Effekte diverser Kinase- und 5-Lipoxygenase-Inhibitoren auf die O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Produktion .....	66
4.1.2.2	Effekte von Triterpenen auf die fMLP- und PMA-stimulierte O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Produktion.....	71
4.1.2.3	Eigenstimulation durch Triterpene.....	84
4.1.3	Humane PMNL .....	86
4.1.3.1	Effekte diverser Kinase-Inhibitoren auf die O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Produktion.....	86
4.1.3.2	Effekte von Triterpenen auf die fMLP- und PMA-stimulierte O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Produktion.....	90
4.1.3.3	Eigenstimulation durch Triterpene.....	100
4.1.3.4	Effekte von 5-Aminosalicylsäure (Mesalazin) auf die fMLP-stimulierte O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Produktion humaner PMNL.....	101
4.1.4	Photometrische Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität an der NADPH-Oxidase-angereicherten Membranfraktion.....	103
4.2	5-Lipoxygenase-Grb2-Bindungsuntersuchungen .....	105
4.3	Humane Leukozytenelastase.....	107
4.4	Caspase-1.....	110
5	Diskussion .....	115
5.1	NADPH-Oxidase.....	115
5.1.1	Diskussion der methodischen Ergebnisse .....	115
5.1.1.1	Gewählte Methoden.....	115
5.1.1.2	Vergleich der O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> -Produktion von Ratten-PMNL und humanen PMNL bei fMLP- und PMA-Stimulation .....	116
5.1.1.3	Cytochalasin B .....	118
5.1.1.4	Rolle von Calcium .....	119
5.1.2	Effekte der Kinase-Inhibitoren.....	121
5.1.2.1	PI3Kinase: Wortmannin .....	121
5.1.2.2	p38-MAPK: SKF-86002 und SB 203580 .....	122
5.1.2.3	ERK-1/2: PD 98059 und U 0126 .....	124
5.1.3	Effekte der Lipoxygenase-Inhibitoren .....	127

---

5.1.4	Effekte der Triterpene .....	128
5.2	5-Lipoxygenase-Grb2-Bindungsuntersuchungen .....	130
5.3	Humane Leukozytenelastase .....	131
5.4	Caspase-1 .....	132
5.5	Wirkungen von Boswelliasäuren auf 5-LO, HLE, Caspase-1 und O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion im Vergleich .....	134
5.6	Bedeutung der Ergebnisse für die klinische Wirksamkeit von Weihrauchextrakten .....	135
6	Zusammenfassung .....	137
6.1	NADPH-Oxidase .....	137
6.1.1	Effekte von Weihrauchextrakten und Boswelliasäuren auf die NADPH-Oxidase-Aktivität .....	137
6.1.2	Untersuchungen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase .....	138
6.1.2.1	Einfluss von Stimulator, <i>Priming</i> und Spezies .....	138
6.1.2.2	Kinasebeteiligung .....	139
6.2	Humane Leukozytenelastase .....	140
6.3	Caspase-1 .....	140
6.4	5-Lipoxygenase-Grb2-Bindungsuntersuchungen .....	141
6.5	Wirkungen von Weihrauchextrakten und Boswelliasäuren im Überblick .....	141
7	Literatur .....	143